

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E PARASITOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**HUGO PEREIRA ÁVILA**

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE CHALCONAS**

**FLORIANÓPOLIS**

**2008**

**HUGO PEREIRA ÁVILA**

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE CHALCONAS**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: **Prof. Dr. Artur Smânia Jr.**

Florianópolis, 2008

# **“ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE CHALCONAS”**

**por**

**HUGO PEREIRA ÁVILA**

Dissertação julgada e apresentada em sua forma final pelo  
Orientador e membros da Comissão Examinadora.

Comissão Examinadora:

---

Prof. Dr. Artur Smania Júnior – MIP/CCB/UFSC

(Orientador)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andréa Pimenta – Université de Cergy Pontoise (França)

---

Prof. Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti – QMC/CFM/UFSC

---

Prof. Dr. Márcio José Rossi – MIP/CCB/UFSC

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elza de Fátima Albino Smânia – MIP/CCB/UFSC

---

Prof. Dr. Mário Steindel – MIP/CCB/UFSC

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia UFSC

Florianópolis, fevereiro de 2008

## **AGRADECIMENTOS**

Não poderia deixar de agradecer ao meu orientador, Prof. Dr. Artur Smania Júnior, que em nenhum momento mediu esforços para a ajuda da pesquisa para a confecção deste trabalho. Mais do que orientador, foi conselheiro e amigo.

Em particular, agradeço à Profa. Dra. Elza de Fátima Albino Smânia e ao colega Marcelo Quint pelo apoio constante em todos os momentos.

Agradeço ao Prof. Franco Delle Monache pelo material fornecido.

Também agradeço aos colegas, professores, secretárias e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia pelo companheirismo, amizade e disposição para auxiliar e dar apoio em todos os momentos.

Finalmente, agradeço à minha esposa Vanilda e ao meu filho Vinicius pelo apoio durante o período em que ficaram privados da minha presença para que eu pudesse completar o meu curso. Amo vocês!

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	vi
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	vii
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	ix
<b>SÍMBOLOS</b> .....	x
<b>RESUMO</b> .....	xiii
<b>ABSTRACT</b> .....	xiv
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
Produtos naturais como fonte de novos fármacos .....	7
Plantas medicinais .....	11
Agentes antimicrobianos .....	13
Determinação da atividade antimicrobiana de produtos naturais .....	17
Aspectos estruturais e químicos das chalconas .....	18
Biossíntese das chalconas .....	21
Efeitos biológicos das chalconas .....	22
Atividade antimicrobiana de chalconas .....	23
Atividade antitumoral de chalconas .....	27
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	31
Objetivo geral .....	31
Objetivos específicos .....	31
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	32
Chalconas .....	32
Avaliação da atividade antimicrobiana .....	35
Solventes utilizados .....	35
Meios de cultura .....	35
Estirpes bacterianas .....	35

Ativação e teste de pureza das bactérias .....	36
Preparo do inoculo bacteriano .....	36
Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) .....	37
Determinação da concentração bactericida mínima (CBM) .....	38
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>39</b>
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>45</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>46</b>
<b>GLOSSÁRIO .....</b>	<b>59</b>
<b>APÊNDICE A – Fórmulas estruturais das 31 chalconas e di-hidrochalconas .....</b>	<b>62</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Exemplos de fármacos obtidos a partir de matérias-primas vegetais .....	10
Tabela 2 – Exemplos de adjuvantes farmacêuticos de origem vegetal .....	11
Tabela 3 – Substituintes de chalconas .....	32
Tabela 4 – Atividade antibacteriana de 31 chalconas (em µg/mL) .....	39

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1– Alexander Fleming e o fungo <i>Penicilium notatum</i> .....	14
Figura 2– Estrutura química dos flavonóides (a) e de seus precursores, as Chalconas (b) .....	20
Figura 3 – Estrutura química das chalconas eripostirene (a) e angolensina (b) .....	25
Figura 4– Estrutura das licochalconas A e C .....	25
Figura 5 – Estrutura química das chalconas isoliquiritigenina (a) e isoprenil (b) .....	29
Figura 6 – Estrutura básica de chalconas (a) e di-hidrochalconas (b) .....	32
Figura 7 – Preparo do inoculo bacteriano .....	37



## LISTA DE ABREVIATURAS

AS	Ácido Salicílico
AAS	Ácido Acetil Salicílico
ATCC	Coleção de Cultura Tipo Americana ( <i>American Type Culture Collection</i> )
BHI	Infusão Cérebro e Coração ( <i>Brain Heart Infusion</i> ).
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
DMSO	Dimetil Sulfóxido
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
IC <sub>50</sub>	Concentração requerida para atingir 50 % do efeito inibitório <i>in vitro</i>
INT	<i>p-IodoNitroTetrazolium Violet</i>
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade ( <i>Lipoprotein Density Low</i> )
RL	Radicais livres
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
pH	Potencial Hidrogeniônico
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UV	Ultravioleta

## SÍMBOLOS

g	grama
mg	miligrama
mL	mililitro
mg/mL	miligrama por mililitro
°C	graus Celcius
$\alpha, \beta$	alfa, beta
$\mu\text{g}$	micrograma
$\mu\text{L}$	microlitro
$\mu\text{M}$	micromolar
$\mu\text{g/mL}$	micrograma por mililitro
C-2	posição (carbono 2 do anel B)
C-2'	posição (carbono 2 do anel A)
-C=O	carbonila
-C=C-	olefina
-OAc	acetato
-O-CH <sub>2</sub> -O-	metilenodioxi
-OH	hidroxila
-OCH <sub>3</sub>	metoxila
-CH <sub>3</sub>	metila

A minha esposa Vanilda, meu filho Vinicius e  
A Ti Senhor, que és o caminho, a verdade e a vida ...

“A ciência será sempre uma busca,  
jamais um descobrimento real. É  
uma viagem, nunca uma chegada”.

Karl Popper

## RESUMO

A atividade antibacteriana de 31 chalconas foi avaliada contra linhagens bacterianas de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 11778 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Para cada uma dessas chalconas foram determinadas as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) e as Concentrações Bactericidas Mínimas (CBM) pelo método de microdiluição em caldo. As CIMs e CBMs foram consideradas as menores concentrações das substâncias-teste necessárias para inibir o crescimento ou provocar a morte bacteriana e foram expressas em µg/mL. Nenhuma das chalconas testadas apresentou atividade contra bactérias Gram-negativas, porém, contra bactérias Gram-positivas, algumas chalconas foram ativas, em particular, aquelas hidroxiladas em carbonos C-4' e C-4 dos anéis aromáticos A e B, respectivamente e que apresentam substituinte (hidroxila ou metoxila) em carbono C-2' do anel aromático A. Estes resultados sugerem que o efeito inibitório desses compostos está relacionado com determinados padrões de substituição entre os anéis aromáticos.

## PALAVRAS-CHAVE

Chalconas, atividade antimicrobiana, produtos naturais

### ABSTRACT

The antibacterial activity of thirty-one chalcones were tested against bacterial strains *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) were determined by the microdilution method for each of the chalcone. Some of the chalcones tested showed good activity against Gram-positive bacterial, mainly for the chalcones hidroxlated in carbons C-4' and C-4 of aromatics A and B rings, respectively, and with substitution (hidroxil or metoxil) in carbon C-2' of aromatic A-ring. These findings suggest that the inhibitory effect of chalcones might be related to the substitution patterns between aromatics rings.

### KEYWORDS:

Chalcones, antibacterial activity, natural compounds.

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil, com a grandeza do seu litoral, e sendo o detentor da maior floresta equatorial e tropical úmida do planeta, não pode abdicar de sua vocação para os produtos naturais. A Química de Produtos Naturais é, dentro da química brasileira, a área mais antiga e a que, talvez ainda hoje, congregue o maior número de pesquisadores (SANDES e DI BLASI, 2000).

O Brasil é o país com a maior diversidade genética do mundo, com cerca de 55 mil espécies catalogadas de um total estimado entre 350 mil e 550 mil espécies no mundo todo. Considera-se que mais de 50 % dessas espécies estejam nas florestas tropicais, cuja área corresponde a aproximadamente 7 % da superfície da terra. O país é, portanto, um celeiro para o desenvolvimento da pesquisa de novas substâncias, tanto de interesse biológico como não biológico (PINTO *et al.*, 2002).

Metabólitos secundários são produzidos por plantas, fungos, bactérias, protozoários, algas, insetos, animais marinhos e outros seres vivos, em resposta a diversos estímulos externos como competição, mudanças nutricionais e infecções por agressores (STROHL, 2000, p. 39-41). A natureza, de forma geral, tem produzido a maioria das substâncias orgânicas conhecidas. Dentre os diversos reinos da natureza, o reino vegetal é o que tem contribuído de forma mais significativa para o fornecimento de metabólitos secundários, muitos desses de grande valor agregado, devido às suas aplicações como medicamento, cosméticos, alimentos e agroquímicos. Muitas dessas substâncias constituem-se, sobretudo,

em modelos para o desenvolvimento de medicamentos sintéticos modernos ou de fármacos imprescindíveis, com participação num mercado que movimenta, anualmente, cerca de 50 bilhões de dólares (PINTO *et al.*, 2002).

O uso de produtos naturais para o tratamento de doenças que acometem o ser humano é uma prática que vem sendo empregada há muito tempo. Antigos registros escritos por chineses e egípcios, ou a própria Bíblia descrevem a utilização de produtos naturais para fins medicinais, os quais eram usados de forma habitual por vários povos (GRUNWALD, 1995; CRAGG *et al.*, 1997; CALIXTO, 2000). Durante o período anterior à era cristã, que ficou conhecido como civilização grega, vários filósofos são destacados por suas obras sobre história natural. Dentre eles, Hipócrates, considerado o pai da medicina moderna, que se caracterizou por tomar a natureza como guia na escolha dos remédios (*Natura medicatrix*) e Teofrasto (372 aC), discípulo de Aristóteles, que escreveu vários livros sobre a história das plantas. É seu o registro da espécie botânica *Papaver somniferum*, planta cujo princípio ativo é a morfina (PINTO *et al.*, 2002).

O potencial dos produtos naturais tem sido reconhecido, portanto, desde a Antiguidade. A organização estrutural, bem como o papel desses compostos de ocorrência natural nas interações biológicas dos organismos e nos seus ecossistemas está sendo entendida apenas recentemente (BANERJI, 1992, p. 105-113).

Depois da descoberta de medicamentos de origem vegetal, é possível entender a corrida entre algumas indústrias transnacionais pela busca de novas substâncias bioativas. Esta busca foi intensificada nos anos 90, especialmente nas florestas tropicais onde se concentra grande parte da biodiversidade e, especialmente no Brasil, onde a grande maioria das espécies continua sem qualquer estudo químico ou biológico (PINTO *et al.*, 2002).



Os produtos farmacêuticos, juntamente com os agroquímicos, são hoje considerados os dois pilares de sustentação da civilização moderna. A frase *mens sana incorpore sano* é, certamente, o produto ideal de um projeto científico interdisciplinar, cujo resultado final é a qualidade de vida da espécie humana. Neste contexto, os produtos naturais isolados de microrganismos, de uma forma geral, têm uma importância sem precedentes, não só como medicamentos (antibiótico, por exemplo) mas principalmente, como agroquímicos menos danosos à saúde humana (PINTO *et al.*, 2002).

A terapêutica moderna, composta por grande número de medicamentos com ação específica sobre receptores, enzimas e canais iônicos, não teria sido possível sem o suporte dos produtos naturais, principalmente as plantas superiores, as toxinas animais e os microrganismos. São inúmeros os exemplos dos medicamentos desenvolvidos direta ou indiretamente de fontes naturais, sobretudo de plantas. Destaca-se a morfina, a pilocarpina, os digitálicos, a escopolamina, as estatinas, o cromolin, as drogas usadas no tratamento de câncer (vinblastina, vincristina, taxol, campotecinas), os imunossuppressores, os antibióticos, os inibidores da enzima conversora de angiotensina, como o captopril, dentre outros (VERPOORTE, 1998; LAURENCE, 1999; STROHL, 2000; BARREIRO e FRAGA, 2001).

Embora os antibióticos de origem microbiana já venham sendo utilizados na prática médica desde os anos 40, o uso de antimicrobianos derivados de plantas ainda é incipiente. Portanto, muitas são as razões que estimulam o estudo sobre a triagem de novas moléculas com propriedades antimicrobianas a partir de fitoquímicos. Dentre essas, podemos citar o aumento da resistência dos microorganismos aos antimicrobianos tradicionais e a maior

sensibilidade de pacientes tratados com drogas imunossupressoras às infecções fúngicas e bacterianas (COWAN, 1999, p. 564-582).

Os compostos de origem natural desempenham quatro papéis importantes na medicina moderna. Em primeiro lugar, fornecem alguns medicamentos extremamente úteis, cuja produção e comercialização na forma sintética é difícil, se não impossível. Entre eles, estão grupos tão diversificados de substâncias como dos alcalóides da papoula produtora de ópio, do esporão do centeio e das plantas solanáceas; os glicosídeos cardiotônicos da digital; a maioria dos antibióticos e todos os soros, vacinas e produtos afins. De fontes naturais são também retirados compostos básicos que podem ser ligeiramente modificados para se tornarem mais eficazes e/ou menos tóxicos, como por exemplo, as numerosas variações da molécula da morfina. O terceiro papel desempenhado pelos produtos naturais é a sua utilidade como protótipo ou modelo para medicamentos sintéticos que tenham atividades fisiológicas semelhantes às dos originais. A procaína e os anestésicos locais similares a essa costumam ser citados como representantes dessa categoria. Há um quarto papel desempenhado pelos produtos naturais, bem diferentes dos acima citados, mas não menos importante. Alguns produtos naturais contêm compostos que apresentam atividade pequena ou nula em si mesmos, mas devido a facilidade de obtenção desses compostos, os mesmos podem ser usados como molécula-base para produzir drogas potentes por métodos químicos ou biológicos. Por exemplo, a bacatina III é facilmente obtida das folhas de várias espécies de teixo, uma planta rara do Pacífico e, a partir dessa substância, é possível sintetizar o taxol, encontrado apenas na casca dessa planta (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997).

O estudo de novos medicamentos para o tratamento de infecções fúngicas se tornou mais relevante nas últimas décadas, com o aumento do número de incidências causado por fungos, contrapondo-se ao fato de que o número de antibacterianos é significativamente maior que o número de agentes antifúngicos (ALVES *et al.*, 2000).

Um outro fator que atualmente vem sendo focado na área biomédica é o uso crescente de extratos de plantas como alimentos, cosméticos e na indústria farmacêutica (NOSTRO *et al.*, 2000), fazendo surgir uma nova tendência, que focaliza as propriedades nutracêuticas dos alimentos. Entende-se por nutracêutico, um alimento ou parte de um alimento que fornece algum benefício incluindo a prevenção e o tratamento de doenças (DEFELICE, 1992, p. 13-15). Dessa forma, os compostos naturais também podem atuar como nutracêuticos, sendo a base dos componentes presentes nos nutracêuticos eminentemente do reino vegetal, ou seja, fitoquímica.

Um grupo de substâncias importantes para o estudo de antimicrobianos é o das fitoalexinas, compostos que apresentam atividades antimicrobianas e são produzidas pelas plantas quando infectadas por microrganismos fitopatogênicos, como vírus, bactérias e fungos, ou quando está sob a ação de fatores causadores de estresse, como frio, clima árido, luz ultravioleta, entre outros. As fitoalexinas aparecem, em geral, em altas concentrações, em resposta à infecção, desempenhando nas plantas papel semelhante ao dos anticorpos nos animais. Dentre as fitoalexinas, o grupo das chalconas vem despertando interesse biotecnológico, em função das diferentes bioatividades, como antiinflamatórias, antitrombóticas e vasodilatadoras (ZEIGER e LINCOLN, 1998).

Os vegetais desenvolvem mecanismos de defesa contra patógenos, como vírus, bactérias, fungos, insetos, produzindo toxinas contra o agente invasor e adquirindo

resistência à infecção. Desde a década de 60, esses mecanismos são conhecidos, mas somente nos últimos anos, os patologistas vegetais vêm-se dedicando ao estudo das bases moleculares e genéticas deste fenômeno (PINTO *et al.*, 2002).

Já foi descoberto o envolvimento do ácido salicílico (AS) e de seu derivado acetilado (AAS) nas reações de defesa contra patógenos. O ácido salicílico é acumulado no tecido vegetal após a infecção, provocando uma resposta imune, chamada resistência sistêmica adquirida (PINTO *et al.*, 2002).

A resistência antibacteriana global está se tornando um problema de saúde pública crescente, sendo citada para quase todos os antimicrobianos disponíveis. A indústria farmacêutica e as companhias de biotecnologia estão respondendo à ameaça da resistência antibiótica com esforços renovados na descoberta de novos antibacterianos. Estratégias à curto prazo estão focadas na bioprospecção de novos agentes antibacterianos específicos e, à longo prazo, o uso de técnicas de seqüenciamento genômico microbial direcionado para a descoberta de novos agentes ativos contra alvos bacterianos pré-determinados (BAX; MULLAN; VERHOEF, 2000).

Em virtude dos elevados custos de produção de um novo medicamento (entre 350 milhões e 500 milhões de dólares, aproximadamente) e do longo tempo gasto em pesquisas (de 10 a 15 anos), o preço final dos medicamentos para o consumidor é geralmente elevado. Além disso, parte considerável da população de países pobres e em desenvolvimento não tira proveito dos recursos da medicina moderna (MOERMAN, 1991; CALIXTO, 2000).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), 65 a 80 % da humanidade não tem acesso à medicina alopática e recorre à medicina tradicional (especialmente às plantas

medicinais) para tratar suas patologias, seja por habitar longe dos centros urbanos, seja por não poder pagar um tratamento medicamentoso. A OMS não só reconhece, como também estimula o uso dessas plantas, embora recomende cuidados especiais para essa prática. Além disso, os inúmeros efeitos colaterais e ineficiência de alguns medicamentos alopáticos no tratamento de inúmeras doenças proporcionaram, nos últimos anos, um incremento considerável na utilização de produtos naturais (MOERMAN, 1991; CALIXTO, 2000). Os fitoterápicos têm sido, no caso do Brasil e de muitos países, o suporte da indústria farmacêutica genuinamente nacional de pequeno e médio porte (FARIAS *et al.*, 1994).

### **1.1. Produtos naturais como fonte de novos fármacos**

Com o desenvolvimento de novas técnicas analíticas para isolamento e purificação de substâncias, a área referente a produtos naturais é a de maior crescimento no campo da química orgânica. Atualmente existe cerca de um milhão de substâncias derivadas de produtos naturais isoladas de diversas fontes, contribuindo para tal, por um lado, o desenvolvimento da biotecnologia e da bioengenharia e, por outro, novas demandas na terapia humana (BERDY, 1989, p. 3-25).

A pesquisa de novas substâncias de importância na agricultura, na indústria e na medicina vem sendo conduzida usando-se a técnica de *screening* de coleções de entidades químicas, denominadas bibliotecas, e empregando ensaios específicos para sua identificação (DONÁDIO, 2002, p. 175-185).

Os compostos resultantes de reações químicas celulares são denominados metabólitos, sendo divididos em primários e secundários. São primários aqueles responsáveis pelo crescimento e desenvolvimento do organismo (DEMAIN, 2000, p. 233-254); são secundários aqueles metabólitos que não são necessários às funções básicas intracelulares, mas que exercem funções específicas de interação entre microrganismo e ambiente, podendo ser interpretados como uma interface química entre o organismo e os outros seres vivos (BRIZUELA *et al.*, 1998).

Dentre as explicações a respeito da origem dos metabólitos secundários produzidos pelos organismos, está a pressão seletiva natural que inclui respostas a interações de competição, parasitismo e modificações ambientais que alterem a disponibilidade de recursos. Como exemplos desses metabólitos, podem ser citados as micotoxinas (metabólitos de ocorrência natural, produzidos por fungos), cuja ação visa impedir a ação dos insetos predadores, a ação dos antibióticos na defesa territorial e o odor usado para atrair insetos para dispersão de esporos (STROHL, 2000, p. 39-41).

Apesar de todo o avanço ocorrido em síntese química, química combinatória e planejamento racional de fármacos, os produtos naturais continuam sendo investigados por continuarem sendo fonte insubstituível de moléculas biologicamente ativas (HARVEY, 2000, p. 294-300).

As dificuldades no aproveitamento dos recursos naturais com o objetivo de desenvolver fármacos incluem o longo dispêndio de tempo, elevados custos, falta de leis específicas na exploração da biodiversidade, escassez de informações sobre a identidade dos compostos naturais, até a relutância em trabalhar com estes produtos pelos químicos tradicionais (STROHL, 2000, p. 39-41).

A biotecnologia é uma área de investigação que explora sistemas biológicos, microbianos ou de culturas vegetais e animais, visando a obtenção de produtos de interesse industrial. Devido aos microrganismos apresentarem crescimento rápido, menor custo e espaço para crescimento, possibilitando maior controle dos processos operacionais, há mais vantagens no seu uso, principalmente nos processos fermentativos (BENNETT, 1998; DEMAÏN, 2000).

Do ponto de vista histórico, os produtos naturais sempre desempenharam um papel importantíssimo no processo de desenvolvimento de fármacos. A maioria dos fármacos comercializados atualmente é de origem natural ou de produtos sintéticos inspirados em produtos naturais. Tanto os métodos clássicos de isolamento de produtos naturais quanto a utilização de processos de síntese química na geração destas substâncias, são uma fonte promissora de novos compostos protótipos (STROBEL, 2002; DE LAS HERAS *et al.*, 2003; MACIAS *et al.*, 2003).

Dentre os grandes grupos de compostos com estrutura química relativamente simples, que podem sofrer enorme gama de modificações estruturais e que permitem otimizar ou direcionar diferentes atividades biológicas, encontram-se os compostos fenólicos, grupo onde se encontram as chalconas.

Atualmente, há grande interesse sobre a atividade antioxidante, devido a sua habilidade em sequestrar e de reduzir a formação de espécies reativas de oxigênio e eletrófilos, bem como de quelar metais e de inibir o processo químico de nitrosação (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2002).

Apesar do desenvolvimento nas áreas de síntese orgânica, microbiologia industrial, biologia molecular, parte dos fármacos permanece sendo obtida a partir de matérias-primas vegetais, seja pela dificuldade em obter sinteticamente moléculas com a mesma estereoquímica, por exemplo, em fármacos como a artemisinina. Uma lista ilustrativa de fármacos com importância terapêutica atual, obtidos exclusivamente de matérias-primas vegetais, é apresentada na tabela 1 (SCHENKEL; GOSMANN, PETROVICK, 2002).

Tabela 1. Exemplos de fármacos obtidos a partir de matérias-primas vegetais.

<b>Fármaco</b>	<b>Classe terapêutica</b>	<b>Espécie vegetal</b>
Artemisina	Antimalárico	<i>Artemisia annua</i> L.
Atropina	Anticolinérgico	<i>Atropina belladonna</i> L.
Capsaicina	Anestésico tópico	<i>Capsicum</i> spp.
Colchicina	Antirreumático	<i>Colchicum autumnale</i> L.
Digoxina, digitoxina	Glicosídeos cardíacos	<i>Digitalis purpurea</i> L.
Escopolamina	Antiparkinsoniano	<i>Datura</i> spp.
Fisostignina	Antiglaucomatoso	<i>Physostigma venenosum</i> Balf.
Morfina, codeína	Analgésico, antitussígeno	<i>Papaver somniferum</i> L.
Pilocarpina	Antiglaucomatoso	<i>Pilocarpus jaborandi</i> Holmes
Quinina	Antimalárico	<i>Cinchona</i> spp.
Reserpina	Anti-hipertensivo	<i>Rauwolfia</i> spp.
Tubocurarina	Bloqueador neuromuscular	<i>Chondodendron tomentosum</i>
Vimblastina, vincristina	Antitumorais	<i>Catharantus roseus</i> G. Don

Fonte: Schenkel, E.P. et al., 2002. Farmacognosia: da Planta ao Medicamento

Além de fonte de fabricação de fármacos, grande parte dos adjuvantes farmacêuticos empregados nos dias de hoje também são de origem vegetal (tabela 2).



Tabela 2. Exemplos de adjuvantes farmacêuticos de origem vegetal.

<b>Adjuvante</b>	<b>Função principal</b>	<b>Fonte vegetal</b>
Amido e derivados	Aglutinante e desagregante	<i>Zea mays</i> L. <i>Solanum tuberosos</i> L.
Celulose e derivados	Aglutinante, desagregante, formador de gel, espessante, filmógeno, modificador da cedência	<i>Pinnus</i> spp. <i>Eucaliptos</i> spp.
Óleos fixos	Veículo	<i>Arachys hypogaea</i> L. <i>Olea europaea</i> L.
Óleos voláteis	Adequadores e corretivos Organolépticos	<i>Cytrus</i> spp. <i>Mentha</i> spp.
Cera de carnaúba	Excipiente de formas farmacêuticas semi-sólidas	<i>Copernicia prunifera</i> (Miller)
Esteveosídeo	Edulcorante	<i>Stevia rebaudiana</i> Hemsl.
Pectinas	Aglutinante, formador de gel, Espessante	<i>Cytrus</i> spp.
Manteiga de cacau	Base de supositórios	<i>Theobroma cacao</i> L.
Etanol	Veículo	<i>Saccharum officinarum</i> L.

Fonte: Schenkel, E.P. et al., 2002. Farmacognosia: da Planta ao Medicamento

## 1.2. Plantas medicinais

O conhecimento sobre plantas medicinais representa muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. O uso de plantas no tratamento e cura de enfermidades é tão antiga quanto a espécie humana (MACIEL; PINTO; VEIGA, 2002).

O reino vegetal representa um extraordinário reservatório de novas moléculas. Segundo pesquisadores, existem 250 mil espécies de plantas distribuídas no globo.

Entretanto, somente uma pequena porcentagem tem sido investigada fitoquimicamente e a fração submetida para triagem de atividades biológicas ou farmacológicas é ainda menor. Uma vez que plantas podem conter centenas, ou ainda milhares de metabólitos, existe correntemente um ressurgimento de interesse no reino vegetal com uma possível fonte de novos compostos para introdução em programas de triagem terapêutica (HOSTETTMANN; WOLFENDER; RODRIGUEZ, 1997).

Os processos usados para obter uma substância derivada da planta envolvem trabalho interdisciplinar em botânica, farmacognosia, química, microbiologia e toxicologia (HOSTETTMANN; WOLFENDER; RODRIGUEZ, 1997).

Muitos são os trabalhos publicados que demonstram atividades biológicas relacionadas com substâncias isoladas de plantas medicinais. Referindo-se em especial a atividade antibacteriana de extratos e/ou substâncias derivadas de plantas, pesquisadores como Alves *et al.*, (2000), Ojala *et al.*, (2000), Bisignano *et al.*, (2001), Eloff (2001) e Okeke *et al.*, (2001), descreveram alguns desses efeitos.

Atividades antiprotozoários, de extratos de plantas usadas na medicina tradicional na Colômbia, foram demonstradas por Weniger *et al.*, (2001). Esses pesquisadores descreveram efeitos dos extratos contra formas amastigotas e promastigotas de *Leishmania spp.*, e formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Foram descritas, também, propriedades antiparasitárias de compostos isolados de plantas.

Atividade antifúngica, antioxidante, antitumoral e citotóxica foram relatadas por Mackeen *et al.*, (2000). Efeitos antivirais, antiinflamatórios e analgésicos também já foram descritos.

O rápido desaparecimento das florestas tropicais e outras áreas importantes da vegetação têm exigido o acesso a métodos que levam para um isolamento rápido e identificação de produtos naturais bioativos.

### **1.3. Agentes antimicrobianos**

Os antibióticos são substâncias produzidas por várias espécies de bactérias e fungos e, que em baixas concentrações, são capazes de impedir o crescimento ou eliminar seletivamente outros microrganismos. Esse conceito deixa de fora os compostos produzidos sinteticamente que, juntamente com os compostos naturais e seus derivados, são denominados de antimicrobianos (GOODMAN, 2003).

A palavra antibiótico deriva do termo antibiosis, que literalmente significa “contra a vida” (anti = contra; bios = vida). O conceito formal mais aceito por cientistas especializados define o antibiótico como uma substância química que é produzida por um microrganismo e que, em baixa concentração, tem a capacidade de inibir ou matar, seletivamente, outros microrganismos. O componente mais crítico dessa definição é a “seletividade” ou a “toxicidade seletiva” significando que o composto deve inibir ou matar o microrganismo sem inibir ou matar o organismo hospedeiro (por exemplo, o ser humano). Em essência, todas as definições limitam os antibióticos a compostos capazes de atuar em baixas concentrações. Essa definição exclui compostos como o etanol, por exemplo, que são ativos em concentrações maiores e tendem a exercer ação principalmente física sobre os microrganismos (esses compostos são geralmente conhecidos como “anti-sépticos”). A definição formal também exclui os compostos sintéticos que, no entanto, juntamente com

outros compostos naturais e seus derivados, são incluídos na categoria de “antimicrobianos” (que também pode ser subdividida segundo o tipo específico de microrganismo que deve ser inibido, como por exemplo, antifúngicos, antibacterianos, entre outros) (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997).

A primeira descoberta importante entre os antibióticos foi a penicilina e ocorreu acidentalmente, quando Alexander Fleming, em 1928, observou uma cultura de estafilococos, eliminada por *Penicillium notatum* (Figura 1). De acordo com Barreiro e Fraga (2001), em 1941, Florey, Chain e colaboradores iniciaram a utilização experimental dessa substância no tratamento de processos infecciosos em seres humanos. Segundo os mesmos autores, Robert Robinson e colaboradores, em 1943, identificaram a estrutura da penicilina G, tornando viável sua síntese. Em 1944, foram isolados a estreptomicina e vários outros antibióticos produzidos por *Streptomyces griseus*. Os esforços para a descoberta de novos antimicrobianos geraram a descoberta do cloranfenicol em 1947, da eritromicina em 1952, da cicloserina em 1955 e do ácido nalidíxico em 1962.



Figura 1 – Alexander Fleming e o fungo *Penicillium notatum*

Os antibióticos devem ser tóxicos para o patógeno, porém, inócuos para o hospedeiro. Isso significa que o fármaco, em uma concentração tolerada pelo hospedeiro, deve ter capacidade para eliminar ou impedir o crescimento do microrganismo. Por esta

razão, os antibióticos são caracterizados como fármacos de toxicidade seletiva (RANG; DALE; RITTER, 2001).

Há vários critérios para a classificação dos agentes antimicrobianos. De acordo com sua origem, os antimicrobianos podem ser naturais, sintéticos ou semi-sintéticos. De acordo com seu espectro de ação, eles se dividem em três categorias: espectro amplo, espectro intermediário e espectro reduzido. Considerando os efeitos dos antimicrobianos, eles podem ser bacteriostáticos ou bactericidas. Finalmente, os antimicrobianos podem ser classificados de acordo com o seu mecanismo de ação, seja inibindo a síntese da parede celular, atuando na membrana citoplasmática, atuando como análogo estrutural de nutrientes, inibindo a síntese protéica ou inibindo a síntese de ácidos nucleicos (REESE *et al.*, 2002).

Desde sua introdução na clínica médica há mais de sessenta anos, a antibioticoterapia se tornou a principal estratégia para o controle das infecções e o mercado global desses fármacos é estimado atualmente em mais de 25 bilhões de dólares anuais. Desde o início de utilização dos antimicrobianos, bactérias resistentes a novos antimicrobianos lançados no mercado aparecem poucos anos após seu lançamento. A partir de 1994, pesquisadores verificaram que bactérias isoladas de pacientes se mostraram resistentes a todos os antibacterianos disponíveis na época. A resistência não só se desenvolve, como também se dissemina rapidamente. Os principais mecanismos moleculares para a ocorrência de resistência envolvem genes externos aos cromossomos, os quais estão localizados em plasmídeos, além de outros elementos móveis do DNA. Estes genes podem ser transferidos de organismo a organismo, inclusive entre espécies distintas.

Também, a transformação natural *in situ* pode contribuir para a disseminação de genes responsáveis pela resistência (HALL e STOKES, 1993; HALL, 2004).

O incremento do uso de antibióticos na medicina humana e veterinária, na agricultura, na preservação de alimentos, na suplementação de rações de aves e de outros animais tem ocasionado problemas de resistência microbiana às drogas (AZEVEDO, 1998; LEVY, 2001).

Os processos bioquímicos que intervêm na resistência aos antibióticos se baseiam em cinco mecanismos, a saber: 1) o microrganismo pode inativar o medicamento antes que este alcance seu alvo dentro da célula; 2) a superfície da célula pode tornar-se impermeável e impedir a entrada da droga; 3) o medicamento entra na célula, porém é expulso; 4) o alvo do fármaco dentro da célula se altera para que não seja reconhecido pelo antibiótico; e 5) as bactérias adquirem uma via metabólica alternativa que torna ineficaz o antibiótico (AZEVEDO, 1998).

Apesar da ampla disponibilidade de antibióticos clinicamente úteis e análogos semi-sintéticos, a pesquisa contínua de novos agentes anti-infecciosos permanece indispensável, uma vez que a combinação da versatilidade genética dos microrganismos e o uso indiscriminado dos antibióticos têm levado ao aumento da resistência clínica dos microrganismos previamente sensíveis e a emergência de infecções anteriormente incomuns. Além disso, novas classes de antibióticos agindo sobre alvos moleculares completamente diferentes dos atuais não têm sido desenvolvidas há mais de 25 anos. O desenvolvimento de novas drogas antivirais também deve ser mantido, especialmente porque as disponíveis limitam-se ao tratamento de poucas viroses (VANDEN BERGHE e

VLIETINCK, 1991; HANCOCK, 1997; KNOWLES, 1997; LECLERC, 1997, LEVY, 1998).

#### **1.4. Determinação da atividade antimicrobiana de produtos naturais**

Nos diversos trabalhos que visam demonstrar atividade antibacteriana de produtos naturais, são descritos diferentes métodos para detectar tal atividade. Esses métodos não são igualmente sensíveis ou baseados sob o mesmo princípio. Como consequência, os resultados obtidos também passam a ser profundamente influenciado não somente pelo método selecionado, mas também pelos microrganismos usados para fazer o teste e pelas características de solubilidade de cada substância em estudo (VANDEN BERGHE e VLIETINCK, 1991).

A escolha dos organismos-teste obviamente dependerá grandemente do propósito da investigação, podendo ser usados microrganismos específicos ou representantes de todos os grupos importantes desses. Em qualquer das hipóteses, sempre que o objetivo do estudo for encontrar novos metabólitos secundários ativos contra microrganismos, cepas de laboratórios de referência devem ser usadas para que os resultados possam ser comparados entre os diversos laboratórios de pesquisa. Essas estirpes podem ser adquiridas de diversas coleções de cultura como American Type Culture Collection (ATCC), National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), entre outras. O uso de estirpes bem caracterizadas não é a garantia para uma triagem segura e exata, pois várias precauções devem ser tomadas, como por exemplo, cuidados com a manutenção e controle da pureza das culturas (VANDEN BERGHE e VLIETINCK, 1991).

Os métodos de triagem atualmente disponíveis para detectar atividade antibacteriana de produtos naturais se enquadram dentro de três grupos: 1) Métodos de difusão; 2) Métodos bioautográficos; e 3) Métodos de diluição. Os ensaios de difusão e bioautográficos são considerados qualitativos, pois apenas mostram se existe ou não atividade antibacteriana nos produtos naturais. Os métodos de diluição podem ser considerados semiquantitativos ou quantitativos. Quando são testadas poucas concentrações do produto natural (geralmente três diluições) com a finalidade de detectar seu efeito antibacteriano, o método é dito semiquantitativo. Os testes quantitativos, por sua vez, referem-se àqueles em que se executam diluições seriadas do produto natural e determina-se para este, a concentração inibitória e/ou bactericida mínima. Todos esses métodos possuem sensibilidades diferentes e adaptações de cada um deles são usadas. Para facilitar a interpretação dos resultados é importante que as adaptações sejam padronizadas.

### **1.5. Aspectos estruturais e químicos das chalconas**

As chalconas são compostos fenólicos derivados do metabolismo vegetal secundário. Os compostos fenólicos apresentam, como estrutura fundamental, um anel aromático, com um grupamento hidroxila substituindo ao menos um hidrogênio e atuam nas plantas como antioxidantes, antimicrobianos, antifúngicos, fotoreceptores, atraentes visuais e repelentes de predadores.

O termo chalcona é utilizado para caracterizar uma família de compostos possuindo como núcleo fundamental, (ZUANAZZI, 2002, p. 499-526), a estrutura 1,3-difenil-2-propen-1-ona como núcleo fundamental (ZACARIAS *et al.*, 2006).



As chalconas, cujo núcleo fundamental é também chamado benzal-acetofenona (ALLINGER *et al.*, 1976), são compostos precursores da via de biossíntese de flavonóides, sendo encontradas na natureza, em plantas rasteiras ou arbóreas, em diferentes órgãos vegetais, sobretudo nas flores. Uma característica marcante nas chalconas, também verificada em auronas (metabólito secundário pertencente ao grupo dos flavonóides), é a de apresentar pigmentação amarela que passa a vermelha em meio alcalino. Chalconas e auronas são encontradas, em geral, nas mesmas plantas, tendo um papel importante em sistemas ecológicos em função das cores que produzem nos vegetais, pois as cores estão implicadas na polinização como atraentes de insetos e/ou pássaros (ZUANAZZI, 2002, p. 499-526).

Grande parte da cor amarela das plantas é devido à presença de carotenos, mas em certos membros das famílias Asteraceae, Oxalidaceae, Scrophulariaceae, Gesneriaceae, Acanthaceae e Liliaceae, as chalconas dão uma contribuição significativa à pigmentação da corola (ZUANAZZI, 2002, p. 499-526).

Uma classificação primária das chalconas leva em conta o número de substituintes presentes no núcleo B, que podem ser um, dois ou três. As chalconas de origem natural apresentam sempre substituintes e, entre os mais comuns, localizados no núcleo aromático, estão as hidroxilas, metoxilas, *O*-glicosilas, *C*-glicosilas e *C*-alquilas (ZUANAZZI, 2002, p. 499-526).

Quimicamente, as chalconas são flavonóides de cadeia aberta, em que os dois anéis aromáticos são unidos por um sistema de três carbonos, constituindo cetonas  $\alpha$ ,  $\beta$  insaturadas, onde tanto a carbonila (C=O) quanto a porção olefínica (-C=C-) estão ligadas a grupamentos aromáticos (RAO; FANG; TZENG, 2004) Constituem uma classe de agentes

anticancerígenos que, segundo alguns autores, tem mostrado uma promissora eficácia terapêutica frente a uma infinidade de células tumorais, tanto *in vivo* como *in vitro*, destacando-se no tratamento do câncer de estômago (ZACARIAS *et al.*, 2006).

Diferentemente dos flavonóides, as chalconas não possuem, na sua estrutura, o anel pirânico, que é formado pela adição do oxigênio à posição C-2' das chalconas e subsequente ciclização com a cadeia de três átomos de carbono e o anel A (Figura 1) (CESARIN; FERREIRA; BRAZ, 2001).

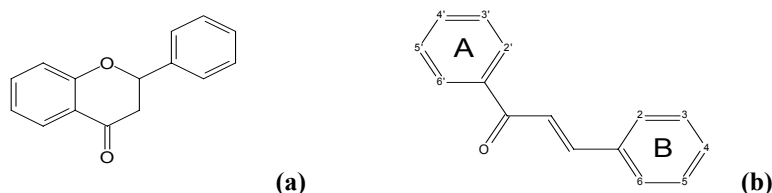


Figura 2 – Estrutura química dos flavonóides (a) e de seus precursores, as chalconas (b)

A importância das chalconas se deve a ampla variedade de propriedades biológicas e químicas que apresentam. Por esta razão, as chalconas têm sido objeto de vários estudos teóricos e experimentais, principalmente visando a determinação de suas estruturas, sua reatividade química, sua atividade antimicrobiana, sua capacidade de inibição e indução enzimática, entre outras aplicações no campo terapêutico (DEVIA *et al.*, 1999).

Do ponto de vista químico, são várias as modificações que podem ser realizadas nas chalconas. De acordo com a natureza dos substituintes, podemos classificar as interações quanto aos efeitos estéricos causados por substituintes volumosos, aos efeitos eletrônicos decorrentes da diferença de eletronegatividade entre átomos ou grupos substituintes, ou a presença de sítios ácido/base de Lewis, possibilitando a formação de ligações de hidrogênio

e/ou complexos intra e intermoleculares (CESARIN; FERREIRA; BRAZ, 2001). Desta forma, as alterações estruturais mais descritas para as chalconas são: substituições nos anéis A e B em diferentes posições (JURCSAK e ZANINI, 1999) e adições halogênicas na dupla ligação (BIEBER, 1999, p. 605-610).

O vínculo intramolecular entre o hidrogênio do grupo hidroxila na posição C-2' e o átomo de oxigênio carbonílico tem um efeito óbvio em muitas propriedades físico-químicas de chalconas hidroxiladas em carbono C-2', tais como absortividade, formação de quelantes metálicos, propriedades espectroscópicas, comportamento ácido-básico, dentre outras (DEVIA *et al.*, 1999).

A estrutura de várias chalconas tem sido estudada através de ensaios de ultravioleta, infravermelho, ressonância magnética nuclear, espectroscopia, assim como por processos dielétricos e teóricos (DEVIA *et al.*, 1999).

### **1.6. Biossíntese das chalconas**

A origem de todos os metabólitos secundários de plantas se resume a partir do metabolismo da glicose, através de dois intermediários principais, que são o ácido chiquímico e o acetato. O ácido chiquímico dá origem aos aminoácidos aromáticos, precursores da maioria dos metabólitos secundários aromáticos. É formado através da condensação aldólica de dois metabólitos da glicose, o fosfoenolpiruvato e a eritrose-4-fosfato (SANTOS, 2002, p. 341-352).

Alguns metabólitos secundários derivam não apenas do ácido chiquímico ou do acetato, mas são resultantes da combinação de uma unidade de ácido chiquímico e uma ou

mais unidades de acetato ou derivados deste, como é o caso das antraquinonas, dos taninos condensados e dos flavonóides, grupo onde se encontram as chalconas (SANTOS, 2002, p. 341-352).

O esqueleto básico das chalconas, dois anéis aromáticos conectados por uma ponte de três átomos de carbono ( $C_6-C_3-C_6$ ), resulta de rotas biossintéticas separadas: a do ácido chiquímico e a do acetato, via ácido malônico. A primeira origina fenilalanina, o precursor do ácido cinâmico, responsável pela unidade fenilpropano por um dos anéis aromáticos (anel B) e a ponte de três carbonos. A segunda resulta no outro anel aromático (anel A), pela conclusão de unidades de malonil-CoA do esqueleto básico das chalconas (SANTOS, 2002, p. 341-352).

### **1.7. Efeitos biológicos das chalconas**

As chalconas pertencem a uma grande classe de metabólitos secundários de plantas que, em muitos casos, atuam como mecanismos de defesa para neutralizar a ação de espécies reativas de oxigênio e espécies reativas de nitrogênio, também chamados radicais livres, para a sobrevivência e para prevenção de danos moleculares e danos provocados por microrganismos, mostrando uma atividade antimicrobiana, além de proteger a planta contra a ação de insetos e de herbívoros (YAYLI *et al.*, 2005). A atividade antioxidante de compostos naturais como chalconas é associada a um número de diferentes mecanismos, tais como seqüestradores de radicais livres, doadores de hidrogênio, queladores de íons metálicos e agindo como substrato de radicais, como superóxido e hidróxido (YAYLI *et al.*, 2005).

Radicais livres são átomos ou moléculas que possuem um ou mais elétrons não pareados (ou desemparelhados) em sua órbita mais externa, formados em geral, pela perda ou ganho de elétrons, processo chamado de oxiredução (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Em meio biológico, a maior parte das moléculas não se encontra na forma de radicais, permanecendo com elétrons pareados. Entretanto, há situações em que os radicais livres são formados, podendo causar efeito fisiológico e patológico (OLSZEWER, 1995; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

Devido ao “stress” oxidativo ser bem conhecido como causa de muitas doenças, cientistas têm considerado de interesse o combate a esse através de fontes naturais, como os componentes ativos de plantas. Antioxidantes, que podem inibir ou retardar a oxidação de um substrato oxidável em uma reação em cadeia, portanto, parecem ser muito importantes na prevenção de doenças (YAYLI *et al.*, 2005).

#### **1.7.1. Atividade antimicrobiana das calconas**

Em relação à atividade antimicrobiana, a efetividade das chalconas e seus derivados contra microrganismos Gram-positivos é freqüentemente maior do que contra bactérias Gram-negativas. No entanto, alguns análogos também podem inibir o crescimento de microrganismos Gram-negativos (OPLETALOVA, 2000, p. 276-284). Já foram relatadas inibições para bactérias: *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* (ALCARAZ *et al.*, 2000), *Escherichia coli* (ALVAREZ *et al.*, 2004), *Staphylococcus epidermidis* (DIMMOCK *et al.*, 1999), dentre outras.

Flavonóides que induzem os genes *nod* (ou gene de nodulação) do rizóbio (bactéria do solo que se associa simbioticamente com espécies leguminosas para a fixação do nitrogênio) têm sido identificados em exsudatos de muitas leguminosas. No caso do feijoeiro, os grupos principais de compostos indutores liberados pelas sementes foram as antocianinas (delfinidina, petunidina e malvidina) e os flavonóis (miricetina e canferol), enquanto que nos exsudatos radiculares foi identificada, também, a chalcona isoliquiritigenina (2',4',4-trihidroxi-chalcona) e a correspondente flavanona liquiritigenina, além das substâncias já citadas (MERCANTE; GOI; FRANCO, 2002).

Cinco componentes fitoquímicos da raiz da leguminosa *Erythrina poeppigiana* (corticeira) foram isolados, sendo três isoflavonóides (eripoegina A, dimetilmedicarpina e sanduicensina) e duas chalconas, a angolensina ( $\alpha$ -metildioxibenzoina) e a eripostirene (4,2'-dihidroxi-4'-metoxi-5'-prenil-chalcona) (SATO *et al*, 2003). Todos os compostos mostraram atividade antibacteriana contra treze isolados de *S. aureus*. Dos cinco compostos analisados, a chalcona eripostirene apresentou o melhor resultado quanto à atividade contra essa bactéria, com valor de CIM em 6,25  $\mu\text{g/mL}$ , seguido de sanduicensina (CIM = 12,5  $\mu\text{g/mL}$ ), eripoegina A (CIM = 25  $\mu\text{g/mL}$ ), dimetilmedicarpina e a chalcona angolensina, ambas com CIM = 50  $\mu\text{g/mL}$  (SATO *et al*, 2003). A chalcona eripostirene inibiu, também, o crescimento de seis amostras de *Candida albicans*, com valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 50  $\mu\text{g/mL}$ , enquanto que os outros compostos não inibiram o crescimento bacteriano, até a concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 3) (SATO *et al*, 2003).

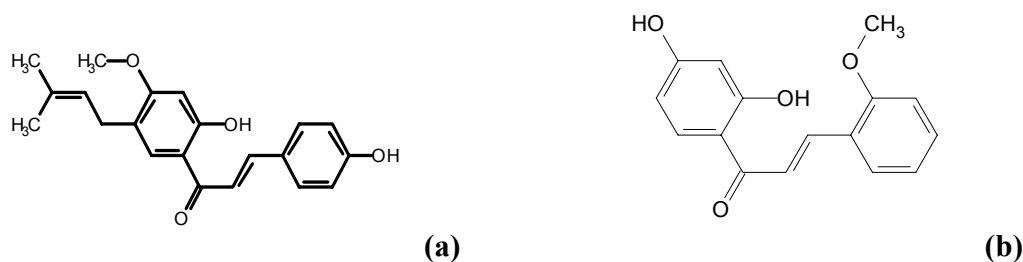


Figura 3 – Estrutura química das chalconas eripostirene (a) e angolensina (b)

Entre as retrochalconas (chalconas que apresentam substituinte oxigenado ligado em posições C-2,3, ou C-2,3,4, ou ainda, C-2,4,6 (ZUANAZZI, 2002, p. 499-526)), a licochalcona A e a licochalcona C, (Figura 4) foram isoladas da raiz de alcaçuz (*Glycyrrhiza inflata*) e testada *in vitro* contra vários microrganismos. Os efeitos bacteriostáticos da licochalcona A foram mostrados com valores de CIM entre 2 µg/mL e 15 µg/mL para todas as bactérias Gram-positivas testadas, incluindo bactérias com esporos, como as dos gêneros *Bacillus* e *Clostridium* e bactérias produtoras de toxinas, como *B. cereus* e *S. aureus*. Em particular, licochalcona A foi ativa para todas as bactérias do gênero *Bacillus* testadas, com valores de CIM entre 2 µg/mL e 3 µg/mL, porém, não mostrou grande atividade contra bactérias Gram-negativas, como *Eschechia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (TSUKIYAMA *et al.*, 2002; NOWAKOWSKA, 2006, p. 125-137).

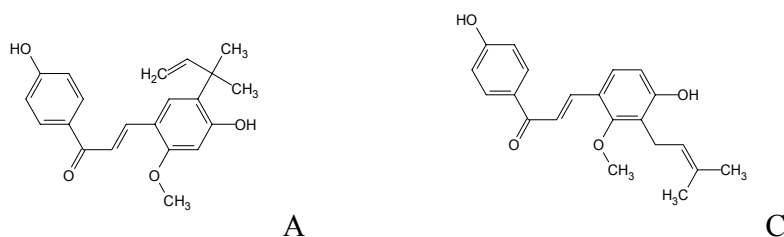


Figura 4 – Estrutura química das licochalconas A e C

Foi relatado que a licochalcona A na concentração de 1 a 2 mg/mL inibiu o crescimento de *Legionella pneumophila*, *L. longheacheae*, *L. wadsworthii*, *L. bozemanii*, *L. dumoffi* e *L. feelei*, com valores de CIM de 25 µg/mL. Além de espécies de *Legionella*, também inibiu o crescimento de *Helicobacter pylori*, *in vitro*, com valores de CIM de 25 µg/mL (NOWAKOWSKA, 2006, p. 125-137).

Kromann *et al.*, (2004) testaram análogos de licochalcona A contra *S. aureus* e concluíram que a presença do grupo hidroxila em posição C-4' é importante para a atividade antibacteriana (NOWAKOWSKA, 2006, p. 125-137).

*Zuccagnia punctata* Cav é uma planta que ocorre em regiões áridas e semi-áridas no oeste Argentino, sendo conhecida devido suas propriedades antissépticas, e seu uso no tratamento de infecções bacterianas e fúngicas, asma, artrite e reumatismo. O extrato etanólico desta planta apresenta alto conteúdo de compostos fenólicos, sendo a 2',4'-dihidroxichalcona, o principal componente químico presente e, provavelmente, o responsável pela boa atividade antibacteriana que o extrato possui. Os valores de CIM encontrados para essa chalcona variaram entre 0,10 e 1,00 µg/mL para as bactérias *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia mercenscens*, *Morganella morganii*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Stenotrophomonas maltophilia* (ZAMPINI *et al.*, 2005). O extrato também foi testado contra *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, apresentando CIM com valores variando entre 25 µg/mL e 200 µg/mL. Para a concentração bactericida mínima, os valores foram idênticos ou duas vezes superiores aos valores da CIM (ZAMPINI *et al.*, 2005).

Alvarez *et al.*, (2004) avaliaram a ação das chalconas hidroxiladas em diferentes posições contra a bactéria *Escherichia coli*. A CIM de 2',4',3-trihidroxi chalcona e 2',4',2-



trihidroxi chalcona tiveram valores de 46  $\mu\text{g/mL}$  e 122  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. A 2',4',4'-trihidroxi chalcona foi inativa para a bactéria. O valor da CIM para 2',4',4'-trihidroxi chalcona (46  $\mu\text{g/mL}$ ) mostrou maior atividade do que o valor de 2',3'-dihidroxi chalcona (CIM = 72,2  $\mu\text{g/mL}$ ). Isto se deve à introdução de um grupo hidroxila na posição C-4' do anel aromático A, que ativa a região que inclui o grupo hidroxila vizinho em C-2' e o grupo carbonila  $\alpha,\beta$ -insaturado.

As chalconas 2'-hidroxi-4,4',5',6'-tetrametoxi chalcona e 4,2'-dihidroxi-4',5',6'-trimetoxi chalcona de *Chromolaena odorata* foram testadas quanto a atividade antibacteriana contra *Mycobacterium tuberculosis*. As chalconas foram inativas na concentração testada (200  $\mu\text{g/mL}$ ) (SUKSAMRARN *et al.*, 2004).

### 1.7.2. Atividade antitumoral de chalconas

Proteínas tirosina-quinases são conhecidas pelo seu importante papel na regulação da proliferação e diferenciação celular. Inibidores de proteínas tirosina-quinase são consideradas potencialmente importantes como agentes terapêuticos para certos cânceres em que as tirosina-quinases são bastante expressadas (YANG *et al.*, 2001).

Chalconas, como buteína (4',6',3,4-tetra-hidroxi-dihidrochalcona), mareína (2',3',4',3,4-penta-hidroxi-dihidrochalcona) e floretina (2',4',6',4-tetra-hidroxi-dihidrochalcona) são inibidoras da atividade de proteínas tirosina-quinases, como receptora do fator de crescimento epidérmico *in vitro*. O  $\text{IC}_{50}$  encontrado foi 8,50  $\mu\text{M}$  para buteína, 19,94  $\mu\text{M}$  para mareína e 25,68  $\mu\text{M}$  para floretina. São consideradas classes potencialmente importantes de agentes terapêuticos de certos cânceres, como mamário e

hepático, em que as proteínas tirosina-quinases são muito expressas. A caracterização estrutural desses inibidores sugere que as hidroxilações em C4 e C4' dessas moléculas podem ser exigidas para que essas chalconas se liguem ao sítio de fixação do ATP do Receptor Epidérmico do Fator de Crescimento (EGFR), inibindo sua atividade tirosina-quinase (YANG *et al.*, 2001).

Estudos prévios demonstraram que os derivados de chalconas oxigenadas em C-2' possuem um amplo espectro de atividade como inibidoras do crescimento de células cancerosas do seio humano, inibidoras da produção de prostaglandina, em macrófagos peritoniais em ratos, inibidoras da expressão de certas proteínas e inibidoras da ciclooxygenase em células novas. Em recente artigo, chalconas hidroxiladas em C-2' são relatadas como inibidoras da oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), por mediação de peroxinitrito. Além disso, alguns derivados de chalconas aminadas em C-2' foram também encontradas com alguma atividade antitumoral (RAO; FANG; TZENG, 2004).

Compostos 2'-oxigenados, como 2',4',6-trimetoxi chalcona, 2'-hidroxi-4',6',5,6-tetrametoxi chalcona e 2'-hidroxi-4',2,5- trimetoxi chalcona foram identificadas como citotóxicos potentes contra um grupo de células linfocíticas humanas anormais, com valores de IC<sub>50</sub> de 2,5 µM, 1,7 µM e 3,2 µM, respectivamente. Paralelamente a este estudo, foi observado que os dois primeiros compostos, mais o composto 2'-hidroxi-3',4',2,3,4-pentametoxi chalcona apresentaram citotoxicidade para células monocíticas humanas anormais, com valores de IC<sub>50</sub> 6,7 µM, 1,5 µM e 5,3 µM, respectivamente (RAO; FANG; TZENG, 2004).

Isoprenil chalcona e isoliquiritigenina (2',4',4-trihidroxi chalcona) são duas chalconas isoladas e identificadas do extrato de alcaçuz (*Glycyrrhiza glabra*), uma leguminosa de raiz adocicada com propriedades medicinais. A isoliquiritigenina, com maior caráter lipofílico, foi considerada ser mais ativa como antioxidante e fitoestrogênica (TAMIR *et al.*, 2001). Ambas, porém, apresentam efeito anticancerígeno mamário. Estas duas chalconas têm uma estrutura similar, incluindo grupos hidroxila idênticos em posições 2', 4' e 4, enquanto a isoprenil chalcona apresenta, em adição, dois grupos isoprenil nas posições 3' e 3 (Figura 5) (TAMIR *et al.*, 2001; MAGGIOLINI *et al.*, 2002).

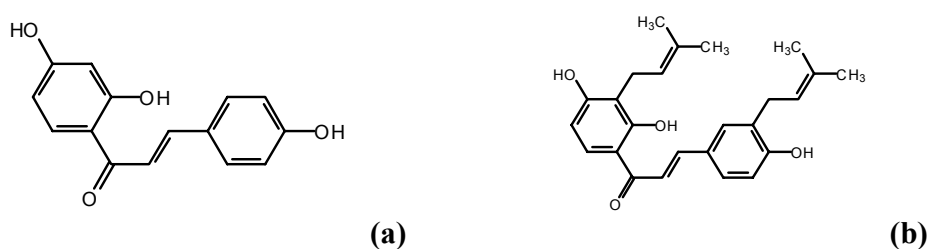


Figura 5 – Estrutura química das chalconas isoliquiritigenina (a) e isoprenil (b)

Foi observado que a presença do grupo metoxila em 2',4',4-trihidroxi-6-metoxi-chalcona em lugar de um grupo hidroxila em 2',4',6',4-tetrahidroxi-3'-prenil-chalcona na posição C-6' do anel A mostrou aumento da atividade inibitória em câncer mamário e de cólon do útero. Já a substituição do grupo prenil (2',4',6',4-tetrahidroxi-3'-prenil-chalcona) na posição C-3' resultou na redução do crescimento do câncer de ovário, mas não do câncer mamário (MIRANDA *et al.*, 1999).

Outros flavonóides prenilados exibem atividade citotóxica contra vários tipos de células cancerosas humanas. É possível que flavonóides prenilados de lúpulo e cerveja possam ter a habilidade de inibir a proliferação de células cancerosas, tendo usos potenciais

como agentes quimioprotetivos contra o câncer. Assim, foi testada a atividade *in vitro* antiproliferativa e citotóxica de flavonóides prenilados de lúpulos em células cancerosas de mama, colon do útero e ovário. Xantohumol, dihidro-ciclo xantohumol e isoxantohumol diminuíram o crescimento de todas as células cancerígenas de forma dose-dependente (0,1 a 100  $\mu\text{M}$ ). Após dois dias de tratamento, as concentrações nas quais o aumento de células do câncer de mama foi inibido em 50 % ( $\text{IC}_{50}$ ) foram 13,3, 15,7 e 15,3  $\mu\text{M}$  para xantohumol, dihidro-ciclo xantohumol e isoxantohumol, respectivamente. Após 4 dias de tratamento, o  $\text{IC}_{50}$  para estes mesmos componentes foram 3,47, 6,87 e 4,69  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Células cancerosas do cólon foram mais resistentes do que células cancerosas de mama para estes flavonóides. Em células cancerosas de ovário, xantohumol foi altamente antiproliferativa com valores  $\text{IC}_{50}$  de 0,52 e 5,2  $\mu\text{M}$  após 2 e 4 dias de exposição, respectivamente. Numa concentração de 100  $\mu\text{M}$ , todos os flavonóides de lúpulo foram citotóxicos para os três tipos celulares. Como agentes antiproliferativos, xantohumol (chalcona) e isoxantohumol (flavanona isômera do xantohumol) podem ter potencial atividade quimiopreventiva contra câncer ovariano em humanos (SEO *et al.*, 1997).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Estudar a atividade antibacteriana de chalconas, visando o controle de microrganismos patogênicos para o homem.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Determinar as concentrações inibitórias mínimas das chalconas, pelo método de microdiluição em meio líquido.
- Determinar as concentrações bactericidas mínimas das chalconas que inibem o crescimento bacteriano.
- Avaliar a influência dos substituintes nos anéis A e B das chalconas, sobre a sua atividade antibacteriana.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Chalconas

Foram utilizadas nos experimentos, as 31 chalconas cuja estrutura básica e nomenclaturas estão citadas a seguir, as quais foram fornecidas pelo Professor Franco Delle Monache, do Instituto di Chimica da Università Cattolica Del Sacro Cuore (Roma – Itália). As fórmulas estruturais das chalconas se encontram em APÊNDICE A.

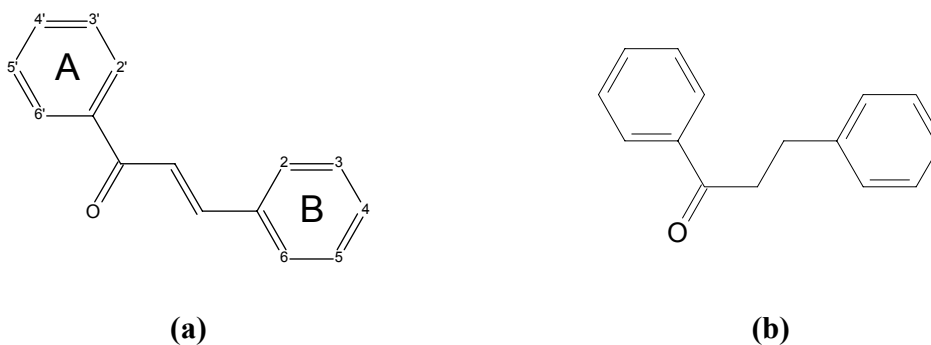


Figura 6 – Estrutura básica das chalconas (a) e di-hidrochalconas (b)

Tabela 3 – Substituintes das chalconas.

CHALCONE											
$\alpha\beta$ -INSATURADAS	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-2'	C-3'		C-4'	C-5'	C-6'
[1]	OCH <sub>3</sub>		OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>		OCH <sub>3</sub>			OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	
[2]			OCH <sub>3</sub>			OH			OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	
[3]		-O-CH2-O-				OCH <sub>3</sub>	OCH3 <sub>3</sub>		OCH <sub>3</sub>		OCH <sub>3</sub>
[4]			OCH <sub>3</sub>						OCH <sub>3</sub>		
[5]							OCH <sub>3</sub>		OCH <sub>3</sub>		
[6]	OH						OCH <sub>3</sub>		OCH <sub>3</sub>		
[7]			OCH <sub>3</sub>			OAc	OCH <sub>3</sub>		OCH <sub>3</sub>		OCH <sub>3</sub>
[9]	OCH <sub>3</sub>					OCH <sub>3</sub>			OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	
[10]	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>		OCH <sub>3</sub>		OCH <sub>3</sub>		OCH <sub>3</sub>		
[11]						OH			-OCH <sub>2</sub> CHC(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>		
[12]			OH			OH			-OCH <sub>2</sub> CHC(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>		

[13]			OH	-OCH <sub>2</sub> CHC(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	OH		
[14]		OH	OH	-OCH <sub>2</sub> CHC(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	OH		
[15]			OH	-OCH <sub>2</sub> CHC(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	OCH <sub>3</sub>		
[16]	OH		OH	-OCH <sub>2</sub> CHC(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	OCH <sub>3</sub>		
[17]		OH	OH	-OCH <sub>2</sub> CHC(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	OCH <sub>3</sub>		
[18]		OH	OH	-OCH <sub>2</sub> CHC(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	OCH <sub>3</sub>		
[19]		OCH <sub>3</sub>	OH	-OCH <sub>2</sub> CHC(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	OCH <sub>3</sub>		
[20]		OH	OH		OH		
[21]	-OCH <sub>2</sub> CHC(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	OH	OH	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CHC(CH <sub>3</sub> )CH <sub>2</sub> CHC(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	OH		
[22]		OH	OH	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CHC(CH <sub>3</sub> )CH <sub>2</sub> CHC(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	OH		
[23]		OH					OCH <sub>3</sub>
<hr/>							
PIRANOCHALCONAS	C-4		C-2'	C-3'		C-4'	C-5' C-6'
<hr/>							
[24]					-CHCHC(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> O-		
[25]		OH			-CHCHC(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> O-		
[26]			OH			-OC(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CHCH-	
[27]		OH	OH			-OC(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CHCH-	
<hr/>							
DI-HIDROCHALCONAS	C-2	C-3	C-4	C-2'	C-3'	C-4'	C-5' C-6'
<hr/>							
[28]	OH						
[29]		-OCH <sub>2</sub> O-		OCH <sub>3</sub>		OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
[30]				OCH <sub>3</sub>		OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
[31]			OH	OH		OH	OH
<hr/>							

[1] 2,4,5,2',4',5'-hexametoxi chalcona

[2] 2'-hidroxi-4,4',5'-trimetoxi chalcona

[3] 3,4-metilenedioxi-2',3',4',6'-tetrametoxi chalcona

[4] 4,4'-dimetoxi chalcona

[5] 3',4'-dimetoxi chalcona

[6] 2-hidroxi-3',4'-dimetoxi chalcona

[7] 2'-acetil-4,3',4',6'-tetrametoxi chalcona

[8] 2,4,5,3',4'-pentametoxi chalcona

[9] 2,2',4',5'-tetrametoxi chalcona

- [10] 2,3,4,6,3',4'-hexametoxi chalcona
- [11] Cordoina
- [12] 4-hidroxi-cordoina
- [13] Isocordoina
- [14] 4-hidroxi-isocordoina
- [15] Derricina
- [16] 2-hidroxi-derricina
- [17] 3-hidroxi-derricina
- [18] 4-hidroxi-derricina
- [19] 4-metoxi-derricina
- [20] 2',4',4-trihidroxi chalcona
- Isoliquiritigenina
- [21] 2',4',4-trihidroxi-3'-geranil-3-prenil chalcona
- [22] 2',4',4-trihidroxi-3'-geranil chalcona
- [23] 4'-metoxi-4-hidroxi-chalcona
- [24] Lonchocarpina
- [25] 4-hidroxi-lonchocarpina
- [26] Isolonchocarpina
- [27] 4-hidroxi-isolonchocarpina
- [28] 2-hidroxi-dihidro-chalcona
- [29] 2',4',5'-trimetoxi-3,4-metilenedioxi-dihidro chalcona
- [30] 2',4',5'-trimetoxi-dihidro-chalcona
- [31] 2',4',6',4-tetrahidroxi-dihidro chalcona



### **3.2. Avaliação da atividade antibacteriana**

#### **3.2.1. Solventes utilizados**

As chalconas foram dissolvidas em dimetil-sulfóxido (DMSO) (20 % do volume final) e diluídas no meio de cultura utilizado para os testes de atividade antimicrobiana. A dissolução foi feita usando 2,0 mg da amostra para 200 µL de DMSO e 800 µL de caldo de Müller-Hinton, sendo a concentração igual a 2 mg/mL. A partir desta solução, foram preparadas as diluições usadas nos testes de atividade antimicrobiana.

#### **3.2.2. Meios de cultura**

Para a manutenção das culturas e ativação das bactérias, foi usado o caldo infusão de cérebro e coração (“Brain heart infusion”, BHI). Para testar a pureza das culturas, utilizou-se o meio de ágar sangue (“Blood agar base” adicionado de 5 % de hemácias de sangue de carneiro) e, para os testes de atividade antimicrobiana, bem como o preparo do inoculo bacteriano, o caldo e ágar de Müeller-Hinton.

Os meios de cultura foram procedentes dos Laboratórios Difco.

#### **3.2.3. Estirpes bacterianas**

Foram utilizadas as seguintes estirpes bacterianas: *Escherichia coli* ATCC 25922 (American Type Culture Collection), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Bacillus cereus* ATCC 11778. As bactérias foram mantidas em

BHI a  $-20^{\circ}\text{C}$  no Laboratório de Antibióticos do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

### **3.3. Ativação e teste de pureza das bactérias**

As bactérias foram ativadas a partir da transferência de 300  $\mu\text{L}$  de cada cultura-estoque, que se encontra a  $-20^{\circ}\text{C}$ , para 3 mL de caldo BHI. As incubações foram mantidas por 24 h a  $36^{\circ}\text{C}$ , sendo a pureza das culturas verificadas após as primeiras 8 horas de incubação em meio de ágar sangue.

### **3.4. Preparo do inóculo bacteriano**

Após 24 horas da ativação das bactérias, foi retirado, do tubo de ensaio contendo o inóculo, um volume de 0,5 mL e transferido para um tubo de ensaio contendo 4,5 mL de caldo de Muller-Hinton, passando a uma concentração de  $10^{-1}$ . A seguir, foi misturado e retirado 0,5 mL desse tubo e transferido para o segundo tubo contendo 4,5 mL de caldo de Muller-Hinton, passando a concentração para  $10^{-2}$ . Finalmente, foi misturado e retirado 0,5 mL desse segundo tubo e transferido para o terceiro tubo contendo 4,5 mL de caldo de Muller-Hinton, passando a concentração para  $10^{-3}$ . O conteúdo desse terceiro tubo foi utilizado para a adição de 5  $\mu\text{L}$  do inóculo aos orifícios teste e de controle de crescimento na placa de microdiluição, para a determinação da concentração inibitória mínima (figura 7).



Figura 7 – Preparo do inóculo bacteriano

### 3.5. Determinação da concentração inibitória mínima

A atividade antibacteriana foi avaliada através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) pelo método de microdiluição em caldo. As substâncias testes foram dissolvidas em 200  $\mu\text{L}$  de DMSO previamente esterilizado por autoclavagem e as soluções foram adicionadas em 800  $\mu\text{L}$  de caldo Mueller-Hinton. Posteriormente, foram preparadas diluições seriadas das chalconas em concentrações variando entre 2 mg/mL e 0,0156 mg/mL, as quais foram distribuídas em volumes de 100  $\mu\text{L}$  em placa de microdiluição de 96 orifícios. Como controles de crescimento e de esterilidade foram usadas apenas as misturas do meio de cultura e DMSO sem a adição de agentes antimicrobianos. Em cada orifício-teste e de controle de crescimento foram adicionados 5

$\mu\text{L}$  de inóculo bacteriano. Os experimentos foram desenvolvidos em duplicata e as placas foram incubadas por 24 horas a 36 °C. A leitura dos experimentos foi realizada com o uso de revelador de crescimento bacteriano, o INT (2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-feniltrazolio-cloro), na concentração de 0,2 mg/mL do sal, dissolvido em etanol a 70 % (HAMBURGER; CORDELL, 1987). A CIM foi considerada a menor concentração da substância em que foi observada mudança de coloração de amarelo para púrpura. Após revelação com INT, amarelo indica ausência de crescimento microbiano, enquanto que púrpura indica crescimento microbiano. O INT reage com as hidrogenases das bactérias vivas, produzindo coloração rosada a partir do amarelo (SOUZA; MONACHA; SMÂNIA, 2005; VALGAS, C. *et al.*, 2007). O resultado foi expresso em  $\mu\text{g/mL}$ .

### **3.6. Determinação da concentração bactericida mínima**

Para a determinação da concentração bactericida mínima (CBM), foram utilizadas placas de Petri com agar sangue como meio de cultura, de todas as situações em que não houve crescimento bacteriano aparente, observado na microplaca. O procedimento utilizado foi a semeadura por esgotamento, através de alça.

A CBM foi considerada a menor concentração da substância em que ocorreu redução total dos organismos vivos, verificados após 24 horas de incubação, a 36 °C.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 4 – Atividade antibacteriana de 31 chalconas.

Chalcona	<i>B. cereus</i>		<i>E. coli</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>S. aureus</i>	
Ordem	CIM <sup>a</sup>	CBM <sup>b</sup>	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
1	>2000 <sup>c</sup>	>2000	>2000	>2000	2000	2000	>2000	>2000
2	1000	>2000	2000	>2000	1000	>2000	2000	>2000
3	2000	>2000	2000	2000	2000	2000	>2000	>2000
4	>2000	>2000	>2000	>2000	2000	2000	>2000	>2000
5	1000	1000	2000	1000	1000	2000	1000	2000
6	1000	1000	1000	2000	1000	>2000	1000	2000
7	2000	>2000	1000	>2000	1000	2000	2000	>2000
8	2000	>2000	1000	>2000	2000	>2000	2000	>2000
9	<b>250</b>	<b>250</b>	2000	2000	2000	2000	1000	1000
10	2000	2000	2000	>2000	2000	>2000	2000	>2000
11	2000	2000	2000	>2000	2000	2000	2000	>2000
12	1000	1000	2000	>2000	2000	2000	2000	2000
13	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000
14	<b>31,2</b>	<b>31,2</b>	1000	1000	1000	1000	<b>31,2</b>	<b>31,2</b>
15	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	>2000
16	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	>2000
17	1000	1000	2000	2000	2000	2000	2000	2000
18	<b>3,9</b>	<b>3,9</b>	2000	2000	2000	2000	<b>7,8</b>	<b>7,8</b>
19	2000	2000	2000	>2000	2000	2000	2000	2000
20	<b>62,5</b>	<b>62,5</b>	2000	2000	2000	2000	<b>62,5</b>	<b>62,2</b>
21	<b>15,6</b>	<b>15,6</b>	1000	2000	1000	2000	<b>31,2</b>	<b>31,2</b>
22	<b>15,6</b>	<b>15,6</b>	1000	2000	1000	2000	<b>31,2</b>	<b>31,2</b>
23	2000	2000	1000	2000	1000	2000	2000	2000
24	2000	2000	1000	1000	2000	2000	2000	2000
25	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	>2000
26	1000	>2000	2000	>2000	2000	>2000	2000	>2000
27	1000	>2000	1000	>2000	1000	>2000	1000	>2000
28	<b>500</b>	<b>500</b>	2000	2000	1000	2000	<b>500</b>	<b>500</b>
29	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000
30	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	>2000
31	<b>250</b>	<b>250</b>	>2000	1000	2000	2000	<b>250</b>	<b>250</b>

<sup>a,b</sup> Concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima, respectivamente.

<sup>c</sup> Valores expressos em µg/mL.

A Tabela 4 apresenta os resultados da atividade antibacteriana obtidos para as 31 chalconas testadas, onde se pode observar que nenhuma das chalconas apresentou boa

atividade contra bactérias Gram-negativas, com valores de Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima iguais ou superiores a 2000 µg/mL. A parede celular das bactérias Gram-negativas é mais resistente, embora menos espessa do que a parede das bactérias Gram-positivas, que possui maior quantidade de peptidoglicano. As bactérias Gram-negativas apresentam, na parede celular, uma membrana externa exclusiva desse tipo de bactéria, que contém lipopolissacarídeos e fosfolípidos adquirindo, portanto, maior resistência. Além disso, há a presença de porinas, que são proteínas com função seletiva para a passagem de moléculas pequenas.

As chalconas metoxiladas em diferentes posições (compostos de **1** a **10**) apresentaram baixa ou nenhuma atividade antibacteriana na concentração testada. Além das metoxilas, a presença de um substituinte metilenodioxi entre as posições C-3/C-4 no anel B do composto **3**, bem como a presença de um substituinte acetato na posição C-4 do anel B do composto **7** pode ter influenciado na baixa bioatividade desses compostos. É possível que esses substituintes dificultem a provável interação intramolecular na estrutura das chalconas, não proporcionando atividade antibacteriana desses compostos.

As chalconas cordoína (composto **11**) e 4-hidroxi-cordoína (composto **12**), possuem, na posição C-4', um substituinte preniloxi (metil-butenoxi) e também apresentaram baixa atividade antibacteriana.

Comparando-se os resultados da isocordoína (composto **13**) com os resultados da 4-hidroxi-isocordoína (composto **14**), observa-se que o primeiro composto apresentou baixa atividade antibacteriana, enquanto o segundo inibiu o crescimento das bactérias Gram-positivas na concentração de 31,2 µg/mL. A boa atividade do composto **14** também foi

observada quando foram testadas outras chalconas hidroxiladas nas posições C-2' e C-4 e que têm substituintes na posição C-4'. Enquadram-se nessas características, além do composto **14**, a 4-hidroxi-derricina (composto **18**), 2',4',4-trihidroxi chalcona (composto **20**), 2',4',4-trihidroxi-3'-geranil-3-prenil-chalcona (composto **21**) e 2',4',4-trihidroxi-3'-geranil-chalcona (composto **22**). Essa boa atividade antimicrobiana também foi relatada por Sato *et al.* (2003), para chalconas que apresentam o mesmo tipo de estrutura, com valores de CIM para eripostirene em 50 µg/mL contra *C. albicans* e 6,25 µg/mL contra *S. aureus* e resultados de CIM para angolensina em 50 µg/mL contra *S. aureus*. Por outro lado, esses mesmos compostos foram pouco ativos contra as bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, inibindo seus crescimentos somente em concentrações iguais ou superiores a 1000 µg/mL. Observa-se ainda que, com exceção do composto **20**, as chalconas bioativas apresentam em suas estruturas além das hidroxilas e substituintes nas posições indicadas acima, um substituinte prenil na posição C-3'. Nessas chalconas há uma interação intramolecular entre a hidroxila na posição C-2' e o oxigênio da carbonila, produzindo efeito em várias propriedades físico-químicas das chalconas, tais como absorvidade, formação de quelantes metálicos, propriedades espectroscópicas, comportamento ácido-base de Lewis, entres outras. De acordo com RAO *et al.* (2004), é importante a presença da hidroxila na posição C-2', para que haja a interação com a carbonila. Também, de acordo com Alvarez *et al.* (2004), grupos hidroxila em posição C-4' ativam a região que inclui o grupo hidroxila vizinho em C-2' e o grupo carbonila  $\alpha,\beta$  insaturado. Além disso, as hidroxilas nas posições C-2' e C-4 são orientadores orto-para e, ao mesmo tempo, ativadores fortes nas posições orto e para, respectivamente.

O composto **18** apresentou o melhor resultado quando testado contra bactérias Gram-positivas; a presença da metoxila na posição C-4' constitui um grupo doador de elétrons que ativa a região que inclui o grupo hidroxila na posição C-2' e o grupo carbonila  $\alpha,\beta$  insaturado.

Comparando-se as atividades das chalconas derricina (composto **15**), 2-hidroxi-derricina (composto **16**) e 3-hidroxi-derricina (composto **17**) com a atividade da chalcona 4- hidroxi-derricina (composto **18**), verifica-se a importância da presença da hidroxila na posição C-4 na propriedade antibacteriana, junto aos substituintes já mencionados anteriormente. As quatro chalconas aqui citadas possuem os mesmos substituintes no anel A, porém, o único que possui substituinte (hidroxila) no anel B, em posição C-4, é o composto **18**.

Comparando os resultados da 4-hidroxi-derricina (composto **18**) com os resultados da 4-metoxi-derricina (composto **19**), observa-se que quando uma hidroxila (composto **18**) é substituída por uma metoxila (composto **19**) na posição C-4, ocorre drástica diminuição da atividade antibacteriana. A metoxila impede a formação de ligações H e pode também causar efeito estérico.

A chalcona 4-hidroxi-cordoína (composto **12**), embora apresente hidroxilas nas posições C-2' e C-4, não apresentou atividade antibacteriana significativa, possivelmente devido à presença de um substituinte prenilóxi (metil-butenóxi) na posição C-4' (CIM e CBM  $\geq 1000$   $\mu\text{g/mL}$ ). O mesmo ocorreu com a chalcona 2',4-dihidroxi-lonchocarpina (composto **27**), possivelmente devido à presença da estrutura benzopiranyl entre os



carbonos nas posições C-4' e C-5'; os resultados obtidos para CIM e CBM foram semelhantes àqueles encontrados para o composto **12**.

O composto **23** é hidroxilado na posição C-4, porém a presença da metoxila na posição C-4' pode ter influenciado para a baixa atividade (CIM  $\geq 1000$   $\mu\text{g/mL}$ ) contra as bactérias testadas. Isto mostra a importância da ligação H da hidroxila em posição C-4, para o grupo farmacofórico. Além disso, a presença da hidroxila em C-4 possui um efeito de ressonância, que mantém a planaridade e a rigidez da molécula.

A chalcona **18** também tem metoxila na posição C-4' e apresentou boa atividade contra bactérias Gram-positivas. A diferença está na presença da hidroxila em posição C-2' na chalcona **18**.

As piranochalconas, isto é, chalconas que possuem um anel pirano condensado ao anel aromático do núcleo da chalcona nas posições C-3'/C-4' da lonchocarpina e 4-hidroxi-lonchocarpina (compostos **24** e **25**, respectivamente), ou mesmo nas posições C-4'/C-5' da isolonchocarpina e 2',4-dihidroxi-lonchocarpina (compostos **26** e **27**, respectivamente), constituíram uma classe de chalconas testadas e que apresentaram pouca ou nenhuma atividade antimicrobiana, conforme mostra a Tabela 4. Os resultados sugerem que a presença do anel pirano condensado à estrutura geral da chalcona não é um fator estrutural importante para a atividade antibacteriana da chalcona, embora o composto **27** (2',4-dihidroxi-lonchocarpina) tenha apresentado pequena atividade (CIM = 1000  $\mu\text{g/mL}$ ) para todas as cepas utilizadas, possivelmente devido às hidroxilações nas posições C-4 e C-2' deste composto.

As piranochalconas apresentaram pouca ou nenhuma atividade antibacteriana. Há uma perda de rigidez da molécula e mais energia é envolvida para manter a conformação adequada para as interações do grupo farmacofórico. Dessas, a que apresentou melhor resultado foi a chalcona 2',4',6',4-tetrahidroxi-dihidro-chalcona (composto **31**), com valor de CIM e CBM de 250 µg/mL contra as bactérias Gram-positivas, possivelmente devido à interação das hidroxilas nas posições C-2' e C-6' com a carbonila, o que coincide com o que sugere RAO *et al.* (2004). A chalcona 2-hidroxi-dihidro chalcona (composto **28**) apresentou pequena atividade, com valores de CIM e CBM de 500 µg/mL para essas bactérias. As chalconas 2',4',5'-trimetoxi-3,4-metilenodioxi-dihidro-chalcona (composto **29**) e 2',4',5'-trimetoxi-dihidro chalcona (composto **30**) não apresentaram boa atividade antibacteriana. A pouca ou nenhuma atividade destas chalconas contra as bactérias testadas, se deve, possivelmente, à perda da rigidez da molécula, com conseqüente maior requisito em energia para manter a conformação adequada para as interações do grupo farmacofórico com o alvo biológico.

A baixa ou nenhuma atividade antibacteriana de algumas chalconas pode estar relacionada com a presença de várias metoxilas em determinadas posições e a ausência de substituintes, como hidroxilas e prenil em posições já discutidas neste trabalho, fazendo com que não haja uma interação entre esses substituintes. Além disso, a ausência de hidroxila na posição C-2', importante para que haja uma interação intramolecular entre a hidroxila nessa posição e o oxigênio da carbonila na estrutura da chalcona, pode ser causa da baixa atividade de algumas chalconas.

A boa atividade antibacteriana de algumas chalconas estudadas no presente trabalho nos estimula a testar estas substâncias contra bactérias multi-resistentes.

## 5. CONCLUSÕES

A chalcona 4-hidroxi-derricina (composto **18**) foi o composto que, de uma maneira geral, apresentou o melhor resultado em termos de atividade antibacteriana. Substituições na estrutura básica deste composto alteraram a atividade antibacteriana, ou seja, a presença da hidroxila nas posições C-2 (composto **16**) ou C-3 (composto **17**), ao invés da posição C-4 (composto **18**), ou ainda, a ausência da hidroxila no anel B (composto **15**), levaram a uma baixa atividade antibacteriana.

Chalconas que possuem substituinte prenil ou geranil na posição C-3' e que possuem substituinte hidroxila nas posições C-4 e C-2', além de substituinte na posição C-4', mostraram boa atividade contra bactérias Gram-positivas.

Chalconas metoxiladas em várias posições dos anéis A e B apresentaram baixa atividade antibacteriana. Da mesma forma, chalconas com substituinte preniloxi (ou butenoxi) no anel A, apresentaram baixa atividade.

Pirano-chalconas apresentaram baixa atividade antibacteriana, possivelmente devido a presença do anel extra de seis elementos na estrutura principal da chalcona..

As dihidrochalconas apresentaram baixa atividade antibacteriana, talvez devido a influência da presença de saturação entre os carbonos  $\alpha$  e  $\beta$ .

Como perspectiva, sugere-se estudar a chalcona 4-hidroxi-derricina, bem como as chalconas 4-hidroxi-isocordoína, 2',4',4'-trihidroxi chalcona, 2',4',4'-trihidroxi-3'-geranil-3'-prenil chalcona e 3',4',4'-trihidroxi-3'-geranil chalcona, como protótipos para futuras explorações referentes a antimicrobianos derivados de chalconas.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLINGER, N.L.; CAVA, M.P.; JOGH, D.C.; JOHNSON, C.R.; LEBEL, N.A.; STEVENS, C.L. **Química Orgânica**, 2ª ed., LTC-Livros Técnicos e Científicos Editora S.A, Rio de Janeiro, 1976, 962 p.

ALVAREZ M.; ZARELLI, E.P.; PAPPANO, N.B.; DEBATTISTA, N.B. Bacteriostatic action of synthetic polyhydroxylated chalcones against *Escherichia coli*. **Biocell.**, v. 28, 2004, p. 31-34.

ALVES, T.M.A.; SILVA, A.F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T.S.M.; SMÂNIA, E.F.A.; SMÂNIA JR., A. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, vol. 95(3), 2000, p. 367-373.

AZEVEDO, J.L. **Genética de Microrganismos**. Goiânia. Editora da UFG, 1998, 490 p.

BANERJI, A. Biotechnical potential of natural products. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 27, 1992, p. 105-113.

BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M. **Química Medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos**. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, 2001, 230 p.

BAX, R.; MULLAN, N.; VERHOEF, J. The millennium bugs – The need for and development of new antibacterials, **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 16, 2000, p. 51-59.

BENNETT, J.W. Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. **Journal of Biotechnology**, v. 66, 1998, p. 101-107.

BERDY, J. The discovery of new bioactive microbial metabolites. **Progress in Industrial Microbiology**, v. 27, 1989, p. 3-25.

BIEBER, L.M. Química Orgânica Experimental: integração da teoria, experimento e análise. **Química Nova**, v. 22, n. 4, 1999, p. 605-610.

BISIGNANO, G. *et al.* *In vitro* antibacterial activity of some aliphatic aldehydes from *Olea europaea* L. **FEMS Microbiology Letters**, v. 198, 2001, p. 9-13.

BRIZUELA, M.A. *et al.* Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios. (Revision). **Revista Iberoamericana de Micología**. v. 15, 1998, p. 69-74.

CALIXTO, J.B.. Efficacy, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutics agents). **Brasilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, 2000, p. 179-189.

CARVALHO, J.C.T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E.P. Compostos fenólicos simples e heterosídeos. In: SIMÕES, C.M.O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 4ª ed., Porto Alegre/Florianópolis, Ed. Universidade UFRGS/Ed. Da UFSC, 2002, p. 499-526.

CESARIN, D.S.; FERREIRA, J.N.; BRAZ, R.F. Efeito da substituição por átomos de flúor no equilíbrio conformacional de chalconas. **Química Nova**, v. 24, n. 5, 2001, p. 604-611.

COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, 12, 1999, p. 564-582.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J.; SNADER, K.M. Natural products in drug discovery and development. **Journal of Natural Products**. v. 60, 1997, p. 52-60.

DEFELICE, S.L. The nutraceutical initiative: a recommendation for U.S. economic and regulatory reforms. **Genetic Engineering New**. v. 12, 2002, p. 13-15.

DE LAS HERAS, B. *et al.* Terpenoids: sources, structure elucidation and therapeutic potential in inflammation. **Curr. Top. Med. Chem.**, v. 3, n. 2, 2003, p. 171-185.

DEMAIN, A.L. Fungal secondary metabolism: regulation and functions. In: SUTTON, B. **A Century of Mycology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1996, p. 233-254.

DEVIA, A.C.; FERRETTI, F.A.; PONCE, C.A.; TOMÁS, F. Conformational equilibrium and intramolecular hydrogen bond of 4'X and 4X substituted 2'(OH) chalcones. **Journal of Molecular Structure** (Theochem), v. 493, 1999, p. 187-197.

DIMMOCK, J.R. *et al.* Bioactivities of chalcones. **Curr. Med. Chem.**, v. 6, 1999, p. 1125-1149.

DONÁDIO, S. Targets and assays for discovering novel antibacterial agents. **Journal of Biotechnology**, v. 99, 2002, p. 175-185.

ELOFF, J.N. Antibacterial activity of Marula (*Scleocarya birrea* (A. rich.) Hochst. Subs. *Caffra* (Sond.) Kokwaro) (*Anacardiaceae*) bark and leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, 2001, p. 305-308.

FARIAS, M.R. *et al.* Espécies vegetais empregadas na produção de fitoterápicos em Santa Catarina. In: **Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, 12, 1994, Fortaleza. Anais... Fortaleza, 1994, p. 125.

GOODMAN, G.A. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003, 2148 p.

GRUNWALD, J. The European phytomedicines market figures, trends, analyses. **Herbal Gram**. v. 34, 1995, p. 60-65.

HALL, R.M.; STOKES, H.W. Integrons: novel DNA elements wich capture genes by sitespecific recombination. **Genetica**. v. 90, 1993, p. 115-132.

HALL, B.G. Predivting the evolution of antibiotic resistance genes. **Nature Reviews – Microbiology**. v. 2, 2004, p. 430-435.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3<sup>a</sup> ed. New York: Oxford University Press, 1999.

HAMBURGER, M.O.; CORDELL, G.A. A direct bioautographic TLC assay for compounds prossessing antibacterial activity. *Journal of Natural Products*, v. 50, n.1, 1997, p. 19-22.

HANCOCK, R.E.W. The role of fundamental research and biotechnology in finding solutions to the global problem of antibiotic resistance. **Clinical Infections Diseases**, 24 (supll 1), S148-S151, 1997.

HARVEY, A. Strategies for the discovering drugs from previously unexplored natural products. **Drug Discovery Today**, v. 5, 2000, p. 294-300.

HOSTETTMANN, K.; WOLFENDER, J.-L.; RODRIGUEZ, S. Rapid detectionand subsequent isolation of bioactive constituents of crude plant extracts. **Planta Medica**, v. 63, 2002, p. 2-10.



JURCSAK, N.W.; ZANINI, H. Employing NMR Spectroscopy to evaluate transmission of electronic effects in 4-substituted chalcones. **J. Chem. Ed.**, v. 76, n. 5, 1999, p. 653-654.

KNOWLES, D.J.C. New strategies for antibacterial drug design. **Trends Microbiol.** v. 5, n. 10, 1997, p. 379-383.

LAWRENCE, R.N. Rediscovering natural product biodiversity. **Drug Discovery Today**, v. 4, 1999, p. 449-451.

LECLERC, R. Enterococci acquire new kinds of resistance. **Clinical Infections Disease**, v.24 (suppl 1), 1997, p. 80-83.

LEVY, S.B. The challenge of antibiotic resistance. **Scientific American**, v. 278, n. 3, 1998, p. 32-39.

LEVY, S.B. Antibiotic resistance: consequences of inaction. **Clinical Infections Diseases**, v. 33 (suppl. 3), 2001, p. 124-129.

MACIAS, F.A., *et al.* Allelopathy as a new strategy for sustainable ecosystems development. **Biol. Sci. Space**, v. 17, n.1, 2003, p. 18-23.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA JR, V.F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, 2002, p. 429-438.

MACKEEN, M.M. *et al.* Antimicrobial, antioxidant, antitumour-promoting and cytotoxic activities of different plant part extracts of *Garcinia atroviridis* Griff. Ex T. Anders. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, 2000, p. 395-402.

MAGGLIOLINI, M.; STATTI, G.; VIVACQUA, A.; GABRIELE, S.; RAGO, V.; LOIZZO, M.; MENICHINI, F.; AMDÒ, S. Estrogenic and antiproliferative activities of isoliquiritigenin in MCF7 breast cancer cell,. **Journal os Steroid Biochemistry & Molecular Biology** , v. 82, 2002, p. 315-322.

MERCANTE, F.M.; GOI, S.R.; FRANCO, A.A. Importância dos compostos fenólicos nas interações entre espécies leguminosas e rizóbio. **Rev. Universidade Rural. Série Ciência da Vida**. v. 22, nº 1. 2002, p. 65-81.

MIRANDA, C.L.; STEVENS, J.F.; HELMRICH, A; HENDERSON, M.C.; RODRIGUEZ, R.J.; YANG, Y.H.; DEINZER, M.L.; BARNEZ, D.W.; BUHLER, D.R. Antiproliferative and cytotoxic effects of prenylated flavonoids from hops (*Humulus lupulus*) in human cancer cell lines. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, 1999, p. 271-285.

MODZELEWZKA, A.; PETTIT, C.; ACHANTA, G.; DAVIDSON, N.E.; HUANG, P.; KHAN, S.R. Anticancer activities of novel chalcone and bis-chalcone derivatives, **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, 2006, p. 3491-3495.

MOERMAN, D.E. The medical flora of native North America: an analysis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 31, 1991, p. 1-42.

MONACHE, F.D.; DE LIMA, O.G.; MELLO, J.F.; MONACHE, G.D.; BETTOLO, G.B.M. Chroman – and chromeno – chalcones from cordoin and isocordoin. **Gaz. Chim. Ital.** 103, 1973, p. 779.

MONACHE, F.D.; MENICHINI, F. SUAREZ, L.E.C. *Petiveria alliacea* II. Further flavonoids and triterpenes. **Gaz. Chim. Ital.** 126, 1996, p. 275.

NOSTRO, A.; GERMANO, M.P.; D'ANGELO, V.; MARINO, A.; CANNATELLI, M.A. Extraction, methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. **Letters in Applied Microbiology**. 30(5): 2000, p. 379-384.

NOWAKOWSKA, Z. A review of anti-infective and anti-inflammatory charcones. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 42, 2006, p. 125-137.

OJALA, T. *et al.* Antibacterial activity of some coumarin containing herbal plants growing in Finland. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, 2002, p. 299-305.

OKEKE, M.I. Evaluation of extracts of the root of *Landolphia owerrience* for antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 78, 2001, p. 119-127.

OLSZEWER, E. **Radicais livres em Medicina**. Efrain Olszeewer. 2ª ed. São Paulo. Fundo Editorial Byk, 1995, 204 p.

OPLETALOVA, V. Chalcones and their heterocyclic analogs as potential therapeutic agents in bacterial diseases. **Ceska Slov. Farm.**, vol. 49, n. 6, 2000, p. 276-284.

PATRICK, G.L. **An introduction to medicinal chemistry**, New York. Oxford University Press, 1995.

PINTO, A.C.; SILVA, D.H.S.; OBOLZANI, V.S.; LOPES, N.P.; EPIFANIO, R.A. Produtos naturais: atualidades, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, Supl.1, 2002, p. 45-61.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. **Farmacologia**. 4ª. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001, 703 p.

RAO, Y.K.; FANG, S.; TZENG, Y. Differential effects of synthesized 2'-oxygenated chalcone derivatives: modulation of human cell cycle phase distribution, **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, 2004, p. 2679-2686.

REESE, R.E.; BETTS, R.F.; GUMSTOP, B. **Manual de antibióticos**. 3ª. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, 630 p.

ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. **Farmacognosia e Farmacobiotechnologia**. 1. ed. Em Português. Editorial Premier, 1997, 372 p.

SANDES, A.R.R.; DI BLASI, G. Biodiversidade e Diversidade Química e Genética. **Biotechnologia**. n. 13, 2000, p. 28-32.

SANTOS, R.I. Metabolismo Básico e Origem dos Metabólitos Secundários. In.: SIMÕES, C.M.O. *et al.* **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 4<sup>a</sup> ed. Porto Alegre/Florianópolis, Ed. Universidade UFRGS/Ed. Da UFSC, 2002, p. 341 a 352.

SATO, M., TANAKA, H., YAMAGUCHI, R., OH-UCHI, T., ETOH, H. *Erythrina poeppigiana*-derived phytochemical exhibiting antimicrobial activity against *Cândida albicans* and methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Letters in Applied Microbiology**. v. 37, 2003, p. 81-85.

SEO, E-K.; SILVE, G.L.; CHAI, H-B.; CHAGWEDERA, T.E.; FARNSWORTH, N.R.; CORDELL, G.A.; PEZZUTO, J.M.; KINGHORN, A.D. Cytotoxic prenylated flavanones from *Monotes engleri*. **Phytochemistry**, v. 45, 1997, p. 509-515.

SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P.R. Produtos de origem e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C.M.O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 4<sup>a</sup> ed., Porto Alegre/Florianópolis, Ed. Universidade UFRGS/Ed. da UFSC, 2002, p. 499-526.

SMÂNIA, A.Jr., DELLE MONACHE, F.; SMÂNIA, E.F.; GIL, M.L.; BENCHETRIT, L.C.; CRUZ, F.S. Antibacterial activity of a substance produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus*, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 45, 1995, p. 177-181.

SOUZA, S.M., MONACHA, F.D., SMÂNIA, A.Jr. Antibacterial activity of coumarins. *Z. Naturforsch.* 60c, 2005, p. 693-700.

STROBEL, G.A. Rainforest endophytes and bioactives products. **Crit. Rev. Biotechnology**, v. 22, n. 4, 2002, p. 315-333.

STROHL, W.R. The role os natural products in a modern drug discovery program. **Drug Discovery Today**, v. 5, n. 2, 2000, p. 39-41.

SUKSAMRARN, A.; CHOTIPONG, A.; SUAVANSRI, T.; BOONGIRD, S.; TIMSUKSAI, P.; VOMUTTIPONG, S., CHUAYNUGUL. Antimycobacterial activity and cytotoxicity of flavonoids from the flowers of *Chromolaena odorata*. **Arch. Pharm. Res.**, v. 27, n. 5, 2004, p. 507-511.

TAMIR, S.; EIZENBERG, M.; SONJEN, D.; IZRAEL, S.; VAYA, J. Estrogen-like activites of glabrene and other constituents isolated from licorice roo,. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 78, 2001, p. 291-298.

TSUKIYAMA, R-I., KATSURA, H., TOKURIKI, N., KOBAYASHI, M. Antibacterial activity of licochalcone A against spore-forming bacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 46, n. 5, 2002, p. 1226-1230.

VALGAS, C.; SOUZA, S.M.; SAMANIA, E.F.A.; SMANIA JR., A. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. **Brazilian Journal of Microbiology**, 38, 2007, p. 370-380.

VANDEN BERGHE, D.A.; VLIETINCK, A.J. Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. In: DEY, P.M. and HARBONE, J.B. **Methods in Plant Biochemistry**, London: Academic Press, 1991, p. 47-69.

VERPOORTE, R. Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development. **Drug Discovery Today**, v. 3, 1998, p. 232-238.

.

YANG, E.B.; GUO, Y.J.; ZHANG, K; CHEN, Y.Z.; MACK, P. Inhibition of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase by chalcone derivatives, **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1550, 2001, p. 144-152.

YAYLI, N.; ÜÇÜNCÜ, O.; AYDIN, E.; GÖK, Y.; YASAR, A.; BALTACI, C.; YILDIRIM, N.; KÜCÜK, M. Stereoselective photochemistry of heteroaryl chalcones in solution and the oxidant activities. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: chemistry** , v. 169, 2005, p. 229-234.

ZACARIAS, N.A.; COSTA, C.E.; CAMPIOTI, D.A.; VIERTLER, H.; SUMODJO, T.A. **Comportamento potenciodinâmico da 1,3-difenil-2-propen-1-ona (chalcona) e 1,3-difenil-3-fenitio-2-propen-1-ona em DMF.** Disponível em: <http://www.s bq.org.br>. Acesso em 27 maio 2006.

ZAMPINI, I.C.; VATTUONE, M.A.; ISLA, M.I. Antibacterial activity of *Zuccagnia punctata* CAV. Ethanolic extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, 2005, p. 450-456.

ZEIGER, E.; LINCOLN, T. **Plant Physiology**; Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland. Massachusetts. 1998, p. 309-334.

ZUANAZZI, J.A.S. Flavonóides. In: SIMÕES, C.M.O. *et al.*. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 4<sup>a</sup> ed., Porto Alegre/Florianópolis, Ed. Universidade UFRGS/Ed. Da UFSC, 2002, p. 499-526.



## GLOSSÁRIO

**Absortividade** – medida ou índice de absorbância. Substância que caracteriza quantitativamente o fenômeno da absorção de uma radiação monocromática por uma solução.

**Análogos** – compostos cuja estrutura química é relacionada a outro composto, podendo manifestar respostas distintas.

**Antibiótico** – substância de origem biológica, hemi-sintética ou sintética, tais como a penicilina e a tetraciclina, que impedem o desenvolvimento de microrganismos patogênicos, atuando por diferentes mecanismos farmacológicos.

**Antiinflamatório** – classe terapêutica responsável pela prevenção e controle de fisiopatologias de origem inflamatória.

**Antioxidante** – substância que impede ou dificulta reações de oxidação, ou que destrói agentes, como radicais livres, causadores dessa oxidação.

**Antitrombótico** – classe terapêutica responsável pelo controle e tratamento de cardiopatias.

**Antitumoral** – classe terapêutica responsável por ação reguladora direta sobre células tumorais.

**Bactericida** – substância capaz de propiciar a destruição definitiva da vitalidade de bactérias.

**Bacteriostático** – substância que evita a multiplicação de bactérias.

**Biodiversidade** – existência, numa dada região, de uma grande variedade de espécies ou de outras categorias taxonômicas de plantas ou de animais.

**Células linfocíticas** – referentes a linfócitos, agranulócitos mononucleares, não fagocitários, encontrados no sangue e na linfa, originados na medula óssea.

**Células monocíticas** – referentes a monócitos, leucócito granulócito, de intensa atividade fagocitária, presente no sangue, no tecido conjuntivo e em alguns órgãos, transformando-se em macrófagos.

**Citotoxicidade** – capacidade de um agente exercer ação lítica específica sobre certas células, principalmente devido à ação imunológica, ou a efeito de medicamento antineoplásico.

**Concentração Bactericida Mínima** – menor concentração da substância em que ocorre redução total dos organismos vivos.

**Concentração Inibitória Mínima** – menor concentração da substância que inibe o crescimento bacteriano.

**Eletrófilo** – substância que é atraída por elétrons: cátions ou moléculas, que contêm átomos com deficiência de elétrons, com tendência a unir-se por ligação covalente ou nucleófilo.

**Elétron desemparelhado (ou não-pareado)** – elétron que não participa de ligação covalente.

**Fitoalexina** – substância produzida por planta como resposta a infecção por fungo ou outro parasita e que reduz ou elimina essa manifestação.

**Fotorreceptor** – célula sensível à luz, encontrada em algumas plantas unicelulares.

**Inibição** – parada ou limitação de função ou de reação orgânica.

**Intramolecular** – que diz respeito ao interior das moléculas.

**Lipoproteína de Baixa Densidade (LDL)** – variedade de lipoproteína que transporta triacilglicerídeos e colesterol endógeno do fígado para os tecidos.

**Metabólitos** – compostos resultantes de reações químicas celulares.

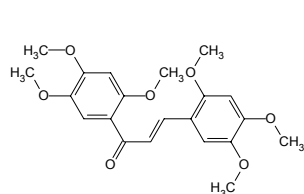
**Metabólitos secundários** – metabólitos não necessários às funções básicas intracelulares, mas que exercem funções específicas de interação entre organismo e ambiente.

**Quimioterápico** – terapia baseada no uso de substâncias químicas.

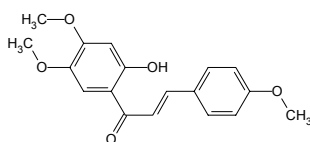
**Radical livre** – qualquer substância, geralmente instável, com tempo de vida curto e muito reativa, com envolvimento em doenças, processos degenerativos e de envelhecimento de seres vivos.

**Vasodilatador** – droga ou agente que provoca o aumento do calibre de vaso sanguíneo.

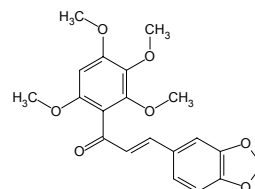
# **APÊNDICE A – Fórmulas estruturais das 31 chalconas e di-hidrochalconas**



[1]



[2]

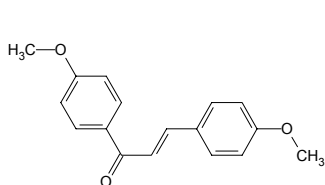


[3]

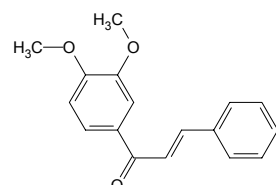
[1] 2,4,5,2',4',5'-6(MeO)-chalcona

[2] 2'-(OH)-4,4',5'-3(MeO)-chalcona

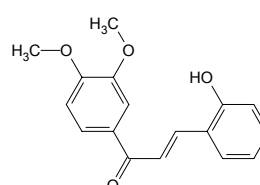
[3] 3,4-metilenedioxi-2',3',4',6'-4(MeO)-chalcona



[4]



[5]

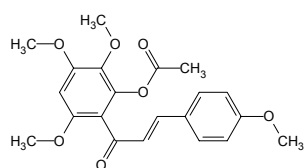


[6]

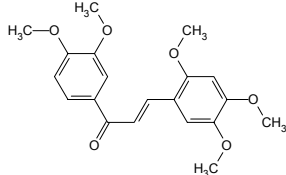
[4] 4,4'-2(MeO)-chalcona

[5] 3',4'-2(MeO)-chalcona

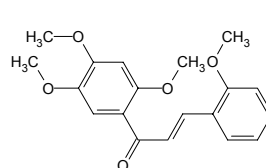
[6] 2-(OH)-3',4'-2(MeO)-chalcona



[7]



[8]

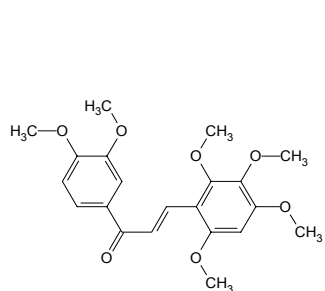


[9]

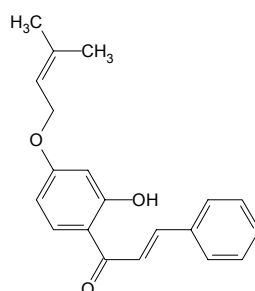
[7] 2'-acetil-4,3',4',6'-4(MeO)-chalcona

[8] 2,4,5,3',4'-5(MeO)-chalcona

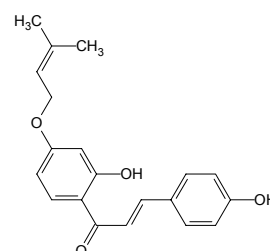
[9] 2,2',4',5'-4(MeO)-chalcona



[10]



[11] Cordoina

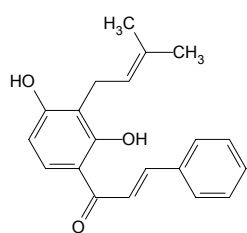


[11]

[12]

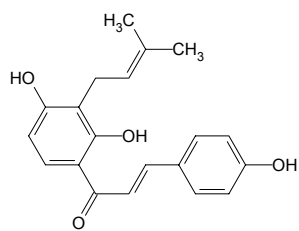
[10] 2,3,4,6,3',4'-6(MeO)-chalcona

[12] 4-(OH)-cordoina



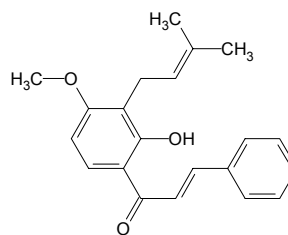
[13]

[13] Isocordoina



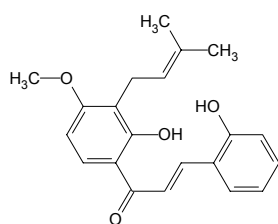
[14]

[14] 4-(OH)-isocordoina



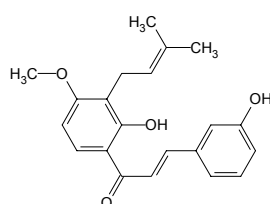
[15]

[15] Derricina



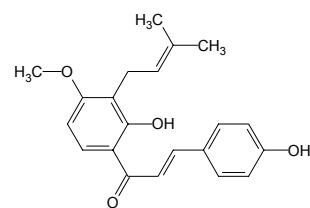
[16]

[16] 2-(OH)-derricina



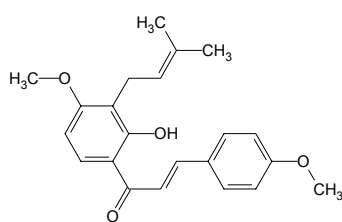
[17]

[17] 3-(OH)-derricina



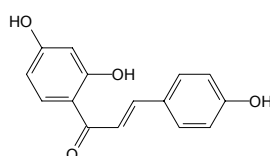
[18]

[18] 4-(OH)-derricina

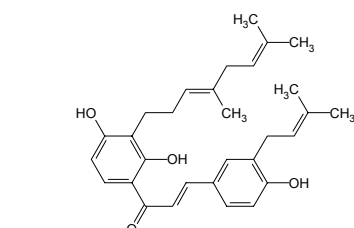


[19]

[19] 4-(MeO)-derricina

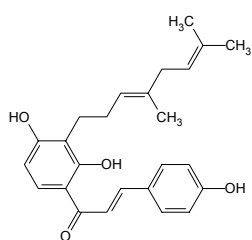


[20] 2',4',4'-3(OH)-chalcona



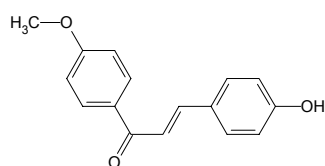
[20]

[21] 2',4',4'-3'-geranyl-3-prenil chalcona



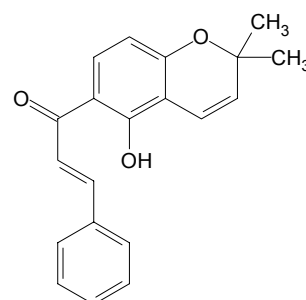
[22]

[22] 2',4',4'-3(OH)-3'-geranyl chalcona



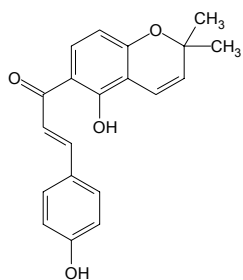
[23]

[23] 4'-(MeO)-4-(OH)-chalcona



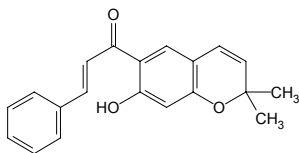
[24]

[24] Lonchocarpina



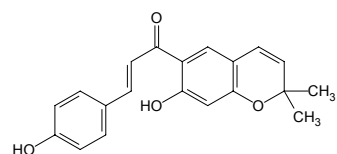
[25]

[25] 4-(OH)-lonchocarpina



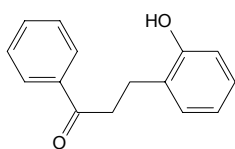
[26]

[26] Isolonchocarpina



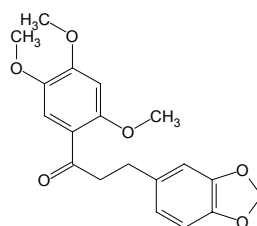
[27]

[27] 4-(OH)-isolonchocarpina



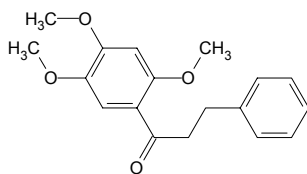
[28]

[28] 2-(OH)-dihidro-chalcona



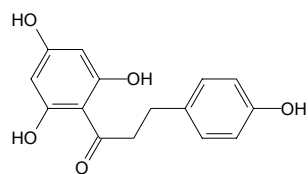
[29]

[29] 2',4',5'-3-(MeO)-3,4-metilenedioxi-dihydro chalcona



[30]

[30] 2',4',5'-3-(MeO)-dihidro-chalcona



[31]

[31] 2',4',6',4-4(OH)-dihidro chalcona